VIRGIL DARIE

MARGARETA GRIGORESCU ILEANA RADULIAN

CĂTĂLINA PISOSCHI DĂNUȚ FIRU

# LABORATOR CLINIC II

Referent științific
Prof. univ. dr. Dinu Tănăsescu

*„Lumină am luat*
*și lumină voi da,*
*celor ce vor lumina"*

# Prefață

Dezvoltarea impetuasă pe plan teoretic a biochimiei în ultimele decenii, a avut repercursiuni și pe plan aplicativ, prin perfecționarea metodologiei experimentale în acest domeniu.

Procesul de interferare a metodelor și conceptelor experimentale ale biochimiei, cu cele ale altor ramuri ale biologiei aplicate, manifestate printr-un proces amplu de conlucrare interdisciplinară a atestat importanța biochimiei analitice, ca unul din factorii determinanți pentru pregătirea complexă a viitorului specialist de laborator clinic.

Biochimia analitică este un atribut complementar și necesar pentru investigarea și interpretarea la nivel molecular a proceselor fiziologice și patologice specifice organismului uman.

Informațiile furnizate de laboratorul clinic contribuie la precizarea diagnosticului unei anumite afecțiuni, prognosticul evoluției sale și controlul eficienței terapiei.

Eforturile biochimiștilor au fost îndreptate în sensul perfecționării unui mare număr de tehnici analitice, precum și utilizarea electronicii pentru aparatura performantă fizico-chimică de analiză.

Lucrarea de față se adresează studenților din profilul medico - farmaceutic și stomatologic, dar prin tematica abordată și conținutul științific poate fi utilă și personalului care deservește laboratorul clinic (chimiști, biologi, medici).

Sperăm ca această lucrare să fie apreciată dar utilitatea ei va fi limitată în timp de dezvoltarea continuă a cunoștințelor teoretice și practice în acest domeniu, fiind necesară reactualizarea acesteia.

Mulțumim d-lui profesor universitar dr. D. Tănăsescu, care ne-a sprijinit prin numeroase observații și prețioase sugestii. De parcursul a 25 de ani de activitate, domnia sa ne-a imprimat un stil de muncă și abordare a metodologiei în biochimia clinică, rezultat al unei bogate experiențe în practica de laborator și cercetare științifică.

*Autorii*

# CUPRINS


**I. EXPLORAREA METABOLISMULUI GLUCIDIC** 1

I.1. GENERALITĂȚI PRIVIND METABOLISMUL NORMAL ȘI PATOLOGIC AL GLUCIDELOR 1

I.2. REGLAREA NEUROHORMONALĂ A GLICEMIEI. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE 4

I.3. GLUCIDE URINARE 8

I.3.1. GLUCOZURIA 8

I.3.2. FRUCTOZURIA 9

I.3.3. GALACTOZURIA ȘI LACTOZURIA 9

I.3.4. PENTOZURIA 10

I.4. METODE DE DOZARE A GLUCOZEI ÎN SÂNGE 10

I.4.1. METODE COLORIMETRICE 11

I.4.1.1. METODA CU O-TOLUIDINĂ (HULTMAN) 11

I.4.2. METODE ENZIMATICE 14

I.4.2.1. METODA ENZIMATICĂ FĂRĂ DEPROTEINIZARE 14

I.4.2.2. METODA ENZIMATICĂ CU HEXOKINAZĂ (CU DEPROTEINIZARE) 16

I.5. DIAGNOSTICUL DIABETULUI ZAHARAT 17

I.5.1. GLICEMIA A JÉUN 17

I.5.2. TESTUL ORAL DE TOLERANȚĂ LA GLUCOZĂ 18

I.5.3. DETERMINAREA PROTEINELOR GLICOZILATE 20

I.5.4. TESTE RAPIDE 22

I.5.5. UTILIZAREA APARATULUI INDIVIDUAL Accu-Chek-Easy 23

**II EXPLORAREA METABOLISMULUI LIPIDIC** 26

II.1. CONSIDERAȚII TEORETICE 26

II.2. STRUCTURA LIPOPROTEINELOR 27

II.3. CLASELE DE LIPOPROTEINE 27

II.4. SEPARAREA LIPOPROTEINELOR PLASMATICE ÎN GEL DE AGAROZĂ (LIPIDOGRAMA) 31

II.5. LIPIDELE TOTALE (LIPEMIA) 33
II.5.1. METODE DE DOZARE A LIPIDELOR TOTALE 34
II.5.1.1. METODA WOODMAN PRICE 34
II.6. COLESTEROLUL 37
II.6.1. DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL 39
II.6.1.1. METODA RAPPAPORT 39
II.6.1.2. MICROMETODA CU ACID 2,5 DIMETILBENZEN SULFONIC 41
II.6.1.3. METODA ENZIMATICĂ 42
II.6.1.4. DOZAREA COLESTEROLULUI LIBER ȘI ESTERIFICAT 43
II.6.1.5. DOZAREA HDL-COLESTEROLULUI 45
II.6.1.6. DOZAREA LDL-COLESTEROLULUI 47
II.7. TRIACILGLICEROLII 48
II.7.1. METODE DE DOZARE A TRIACILGLICEROLILOR 49
II.7.1.1. METODA TIXIER-CLAUDE 50
II.7.1.2. METODA ENZIMATICĂ 52
II.8. FOSFOLIPIDELE 54
II.8.1. DOZAREA FOSFOLIPIDELOR (METODA GOMORI) 55
II.9. ACIZII GRAȘI LIBERI 57
II.9.1. DOZAREA ACIZILOR GRAȘI LIBERI 57
II.10. CORPII CETONICI 59
**III. EXPLORAREA METABOLISMULUI PROTEIC 61**
III.1. CONSIDERAȚII GENERALE 61
III.2. ANALIZA CANTITATIVĂ A AMINOACIZILOR DIN LICHIDE BIOLOGICE 66
III.2.1. DOZAREA AMINOACIZILOR LIBERI (METODA STEIN-MOORE) 66
III.3. PROTEINE PLASMATICE 68
III.3.1. FUNCȚIILE PROTEINELOR PLASMATICE 68
III.3.2. INVESTIGAREA CLINICĂ A PROTEINELOR PLASMATICE. PROTEINEMIA. VARIAȚII FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGICE 71

III.4. METODE DE DOZARE A PROTEINELOR 73
III.4.1. METODA ABSORBȚIEI ÎN ULTRAVIOLET 74
III.4.2. METODA LOWRY 75
III.4.3. METODA BIURET CANTITATIVĂ (WEICHSELBAUM) 76
III.4.4. DETERMINAREA FIBRINOGENULUI 77
III.4.5. METODE IMUNOCHIMICE 78
III.5. PROTEINELE URINARE 80
III.5.1. CATEGORIILE DE PROTEINE URINARE 80
III.5.2. METODELE UTILIZATE LA DETERMINAREA PROTEINELOR URINARE 82
III.6. RAPORT ALBUMINE/GLOBULINE - ELECTROFOREZA - 84
III.7. TESTE DE DISPROTEINEMIE 91
III.7.1. REACȚIA TAKATA-ARA (MODIFICATĂ DE MANKE SOMMER) 93
III.7.2. REACȚIA MAC-LAGAN (TESTUL TIMOL) 94
**IV. COMPUȘI AZOTAȚI NEPROTEICI 96**
IV.1. GENERALITĂȚI 96
IV.2. UREEA 98
IV.2.1. GENERALITĂȚI 98
IV.2.2. VALORI NORMALE ȘI VARIAȚII FIZIOPATOLOGICE 100
IV.2.3. METODE DE DOZARE A UREEI 103
IV.2.3.1. METODA ENZIMATICĂ (BERTHELOT) 103
IV.2.3.2. DETERMINAREA UREEI CU DIACETIL MONOXIMĂ (KITAMWA-JUKY) 105
IV.3. CREATINA ȘI CREATININA 108
IV.3.1. GENERALITĂȚI 108
IV.3.2. IMPORTANȚA FIZIOPATOLOGICĂ. VALORI NORMALE 109
IV.3.3. DOZAREA CREATININEI (METODA FOLIN-WU) 112
IV.4. ACIDUL URIC 113
IV.4.1. GENERALITĂȚI 113
IV.4.2. VALORI NORMALE. VARIAȚII FIZIOPATOLOGICE 115

IV.4.3. METODE DE DOZARE A ACIDULUI URIC 118
IV.4.3.1. METODA FOLIN-DENIS 118
IV.5. BILIRUBINA 121
IV.5.1. METABOLISMUL BILIRUBINEI 121
IV.5.2. PROPRIETĂȚILE FORMELOR DE BILIRUBINĂ 129
IV.5.3. HIPERBILIRUBINEMIA 131
IV.5.4. METODE DE DOZARE A BILIRUBINEI 134
IV.5.4.1. METODA VAN DER BERGH 134
IV.6. FIERUL 138
IV.6.1. METABOLISMUL FIERULUI 138
IV.6.2. VALORI NORMALE. PATOLOGIA FIERULUI 141
IV.6.3. DETERMINAREA FIERULUI SANGUIN METODA HEILMEYER 143
**V. EXPLORAREA METABOLISMULUI HIDROELECTROLITIC 147**
V.1. GENERALITĂȚI 147
V.2. UNITĂȚI DE MĂSURĂ 152
V.3. CLORUL 156
V.3.1. GENERALITĂȚI. ROLURI BIOLOGICE. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE 156
V.3.2. METODA MERCURIMETRICĂ (SCHALES-SCHALES) 158
V.3.3. METODA ARGENTOMETRICĂ (MOHR) 160
V.4. CALCIUL 161
V.4.1. GENERALITĂȚI. ROLURI FIZIOLOGICE. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE 161
V.4.2. METODE DE DOZARE A CALCIULUI 165
V.4.2.1. METODA ELLIOT 165
V.4.2.2. METODA FLAMFOTOMETRICĂ 168
V.4.2.3. METODA COLORIMETRICĂ 171
V.5. FOSFORUL 172
V.5.1. GENERALITĂȚI. ROLURI BIOLOGICE 172
V.5.2. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE 173
V.5.3. DOZAREA FOSFORULUI SERIC. METODA BRIGGS 175

V.5.4. DOZAREA FOSFORULUI URINAR. METODA BRIGGS 177
V.5.4. METODA FĂRĂ DEPROTEINIZARE 178
V.6. MAGNEZIUL 179
V.6.1. CONSIDERAȚII GENERALE 179
V.6.2. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE 182
V.6.3. METODE DINAMICE DE STUDIU AL METABOLISMULUI MAGNEZIULUI 184
V.6.4. DOZAREA MAGNEZIULUI 184
V.6.5. METODA COLORIMETRICĂ 185
**VI. INTERPRETAREA DIAGNOSTICĂ A VARIAȚIEI ACTIVITĂȚILOR ENZIMELOR SERICE** 187
VI.1. CONSIDERAȚII GENERALE 187
VI.1.1. PROVENIENȚA ENZIMELOR 187
VI.1.2. REPARTIZAREA INTRACELULARĂ A ENZIMELOR 189
VI.1.3. REPARTIZAREA ENZIMELOR ÎN ȚESUTURI ȘI ORGANE 190
VI.1.4. IZOENZIME 192
VI.1.5. CAUZELE PREZENȚEI ÎN SER A ENZIMELOR CELULARE 194
VI.2. MODALITĂȚI DE CARACTERIZARE A ENZIMELOR 196
VI.2.1. UNITĂȚI DE EXPRIMARE A ACTIVITĂȚII ENZIMATICE 196
VI.2.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR 197
VI.2.2.1. METODE CINETICE 199
VI.2.2.2. METODE CU TIMP FIX DE INCUBARE 201
VI.2.3. INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI SUBSTRATULUI ȘI STABILIREA VALORII $K_M$ 202
VI.2.4. CLASIFICAREA ENZIMELOR 206
VI.3. ENZIME CU IMPORTANȚĂ DIAGNOSTICĂ 207
VI.3.1. OXIDOREDUCTAZE 207
VI.3.1.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII LDH 207
VI.3.1.2. SEPARAREA ELECTROFORETICĂ A IZOENZIMELOR LDH 209

# I. EXPLORAREA METABOLISMULUI GLUCIDIC

## I.1. GENERALITĂȚI PRIVIND METABOLISMUL NORMAL ȘI PATOLOGIC AL GLUCIDELOR

Glucidele ocupă un rol primordial în metabolismul energetic. Glucoza este singurul reprezentant care se găsește în mod normal în sânge, în cantități apreciabile și constante.

Dacă în urma ingestiei unor anumite alimente apar alte glucide, acestea sunt fie **eliminate** prin urină, fie reținute de ficat și **metabolizate** sau **convertite.**

Sursele glucozei sanguine sunt următoarele:

- **glucoza exogenă** - de origine alimentară și anume din: pâine, lapte, zahăr, cartofi, paste făinoase, legume, fructe, miere;
- **glucoza endogenă** - sintetizată în ficat sau rinichi din aminoacizi glucoformatori, acid lactic, glicerol, prin procesul de **gluconeogeneză.**

Glucidele de origine alimentară (amidonul, glicogenul, zaharoza, lactoza) sub acțiunea enzimelor digestive sunt scindate în oze simple, sunt absorbite în intestin urmând apoi ca prin vena portă să fie aduse la ficat și transformate în **glucozo-6-fosfat.**

Metabolizarea ulterioară a glucozei, pe oricare dintre căile prezentate ulterior, este precedată deci de **fosforilare**, condiție esențială pentru rămânerea ei în celulă. Gruparea fosfat ionizată la pH-ul fiziologic conferă moleculei de glucozo-6-fosfat o încărcare electrică **netă negativă** și **imposibilitatea străbaterii membranei celulare.**

În funcție de nevoile organismului, glucozo-6-fosfatul este transformat pe 5 căi diferite, reglate prin mecanisme hormonale:

- sub acțiunea enzimei glucozo-6-fosfataza este hidrolizat, iar **glucoza liberă** circulă în sânge alimentând celulele tuturor celorlalte organe;

► este degradat până la $CO_2$ și $H_2O$ cu degajare importantă de **energie;**

► este degradat pe calea pentozofosfaților pentru sinteza de nucleotide piridinice reduse (**NADPH + $H^+$**), utilizate în diverse sinteze (colesterol, acizi grași);

► glucoza este stocată în celulele hepatice prin policondensare în **glicogen** (glicogenul dezvoltă aceeași presiune osmotică ca și o moleculă de glucoză); depozitarea glucozei se face fără variația presiunii osmotice intracelulare;

► când celelalte căi sunt practic saturate de un aport excesiv de glucide, glucoza (prin intermediul unei unități de 2 atomi de carbon $CH_3$–CO~SCoA) este transformată în **acizi grași** și, ulterior în **triacilgliceroli**, care se depozitează în țesutul adipos trecând pe via sanguină.

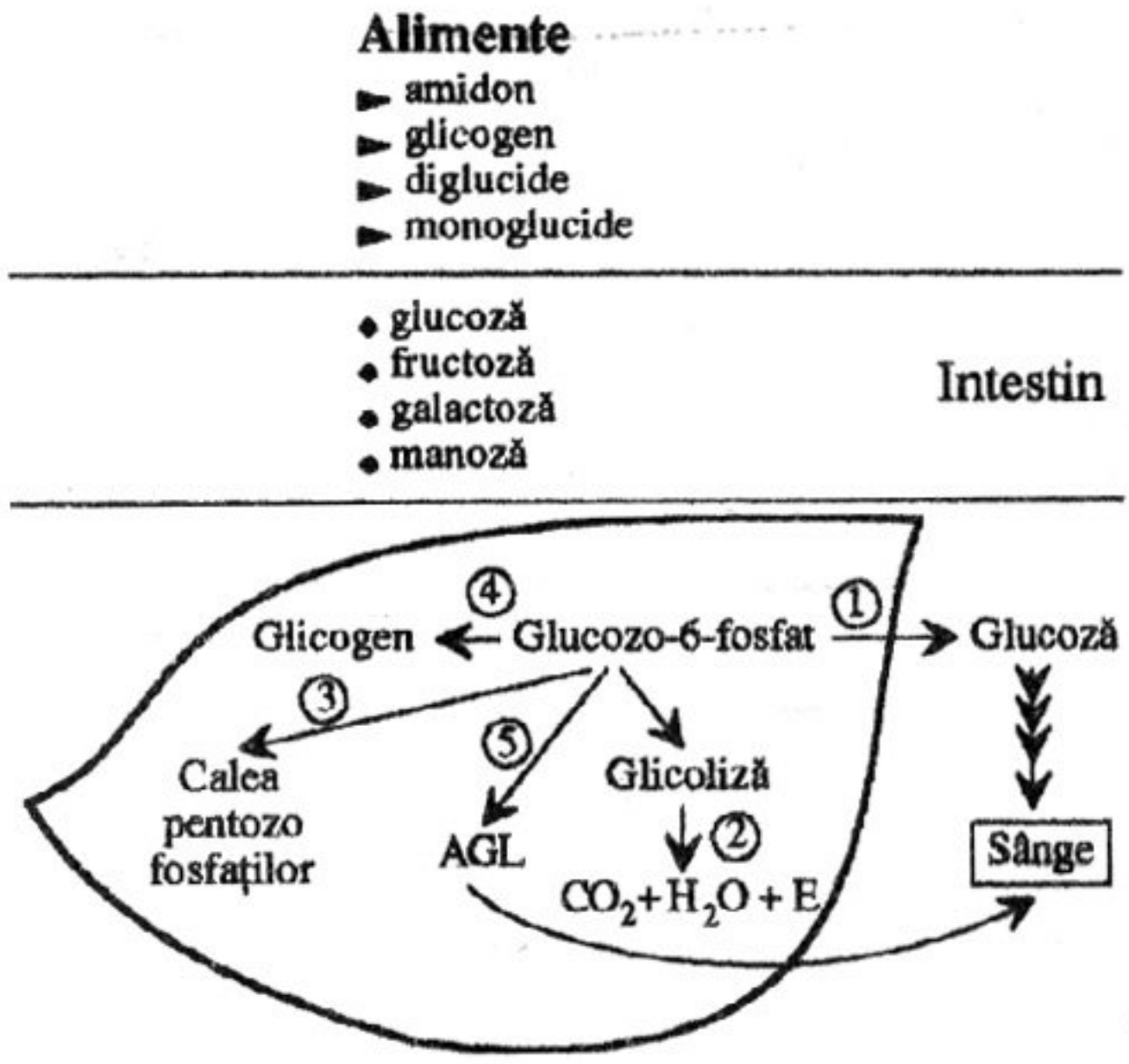



Fig.I.1. **Metabolismul hepatic al glucozei**

Circulația glucozei de la ficat către celelalte organe este permanentă, ficatul fiind singurul organ care lasă glucoza liberă să difuzeze în sânge, în celelalte organe glucoza este transformată în

glucozo-6-fosfat, care nu are posibilitatea de a traversa membranele plasmatice.

Glucoza sanguină este captată de către toate celulele care o utilizează în mod diferit:

- pentru obținerea de energie prin degradare totală până la $CO_2$ și $H_2O$;
- pentru obținerea polimerului de rezervă din mușchi (glicogen);
- pentru a suferi degradarea pe calea pentozo-fosfaților;
- integrarea în structura glicoproteinelor și proteoglicanilor;
- catabolizarea glucozo-6-fosfatului până la acid lactic, care prin intermediul sângelui ajunge la ficat pentru a reforma glucoza.

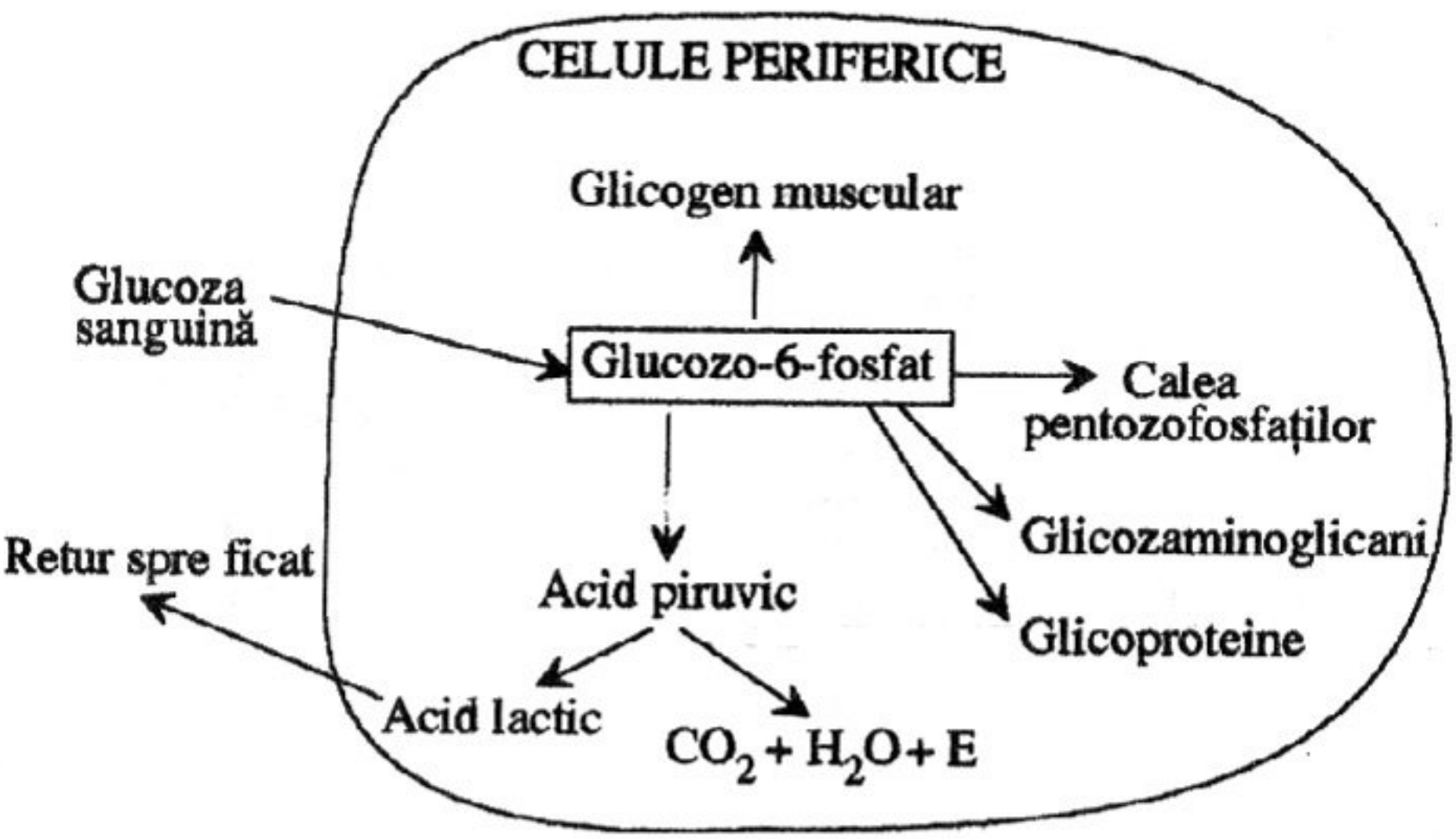



Fig.I.2. **Utilizarea periferică a glucozei**

Menținerea nivelului glucozei sanguine (**glicemia**) între limite normale se realizează prin concurența dintre procesele anabolice și catabolice.

Gluconeogeneza este unul din procesele importante care intervin în reglarea nivelului glicemiei.

În timpul repausului, rezerva hepatică de glicogen prin procesul de glicogenoliză eliberează unități de glucoză care fac să crească nivelul glicemiei. O cantitate minimă de glucoză asigură

alimentarea țesuturilor glucodependente: **creierul**, **eritrocitele** și **medulosuprarenala.**

Dacă procesul de glicogenoliză nu are loc, în ficat poate avea loc gluconeogeneza fie de la derivați glucidici (acid lactic), fie din substanțe neglucidice (aminoacizi, glicerol etc.).

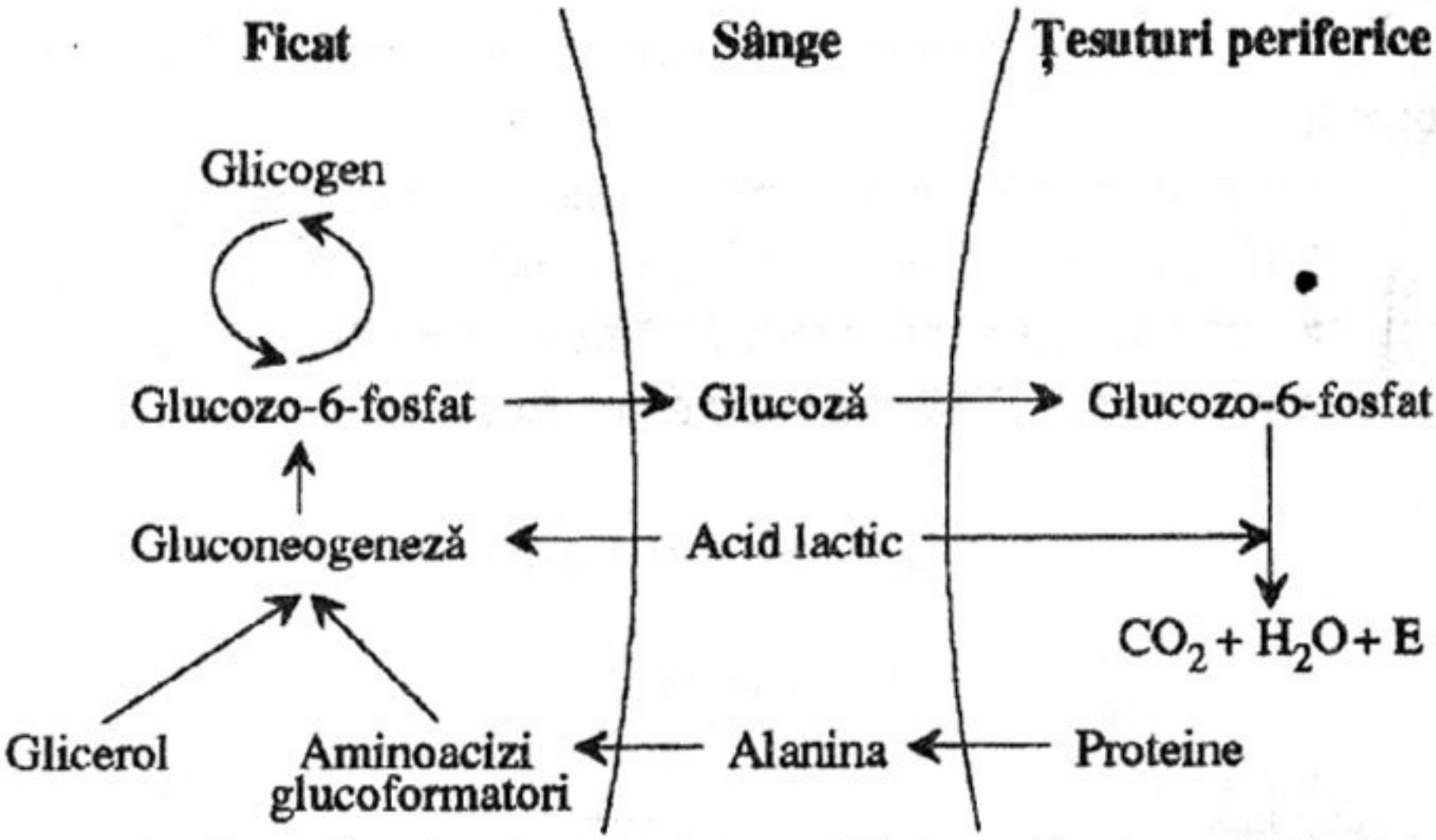



Fig.I.3. **Contribuția gluconeogenezei în menținerea glicemiei**

## I.2. REGLAREA NEUROHORMONALĂ A GLICEMIEI. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE

Menținerea glicemiei între anumite limite (homeostazia glicemiei) este asigurată prin mecanisme de control multiple și la care participă ficatul, țesuturile extrahepatice și o serie de glande endocrine. Mecanismul hormonal de reglare este cel mai important.

- factorii **hipoglicemianți** - insulina este factorul primordial;
- factorii **hiperglicemianți** sunt multipli, dar cei mai importanți sunt de natură hormonală: **glucagonul, catecolaminele, cortizolul, hormonul de creștere (STH), ACTH** - denumiți și **factorii** de **contrareglare.**

Intervenția sistemului nervos în reglarea glicemiei este evidentă, cunoscându-se intervenția mecanismelor nervoase în stress și în controlul glandelor cu secreție internă.

Răspunsul compensator al hormonilor de contrareglare depinde de diferiți factori printre care vom menționa:

- ► nivelul hiperglicemiei;
- ► viteza de instalare a hipoglicemiei;
- ► durata hipoglicemiei.

În hipoglicemiile acute, de scurtă durată, vor interveni numai catecolaminele și glucagonul; în cele prelungite, după o scurtă perioadă de intervenție a hormonilor menționați, efectul hiperglicemiant este preluat de cortizol și STH.

Nivelul concentrației glucozei în sânge - **glicemia** - este menținut între limite constante și anume 60-110 mg/100 ml sânge.

La un adult normal glicemia nu scade și nici nu crește peste aceste limite decât scurt timp, chiar în lipsa glucidelor din alimentație sau după ingerarea unor cantități mari de glucide.

Tabelul I.1. **VALORILE NORMALE ALE GLUCOZEI ÎN LICHIDE BIOLOGICE**

| Lichid biologic | Vârsta | mmol/l | mg/100 ml | Metode |
|---|---|---|---|---|
| Sânge venos, ser, plasmă | nou născut | 2,78-5,27 | 50-95 | enzimatică |
| Sânge venos, ser, plasmă | copii | 4,12-5,27 | 75-95 | enzimatică |
| Sânge venos, ser, plasmă | adulți | 4,44-5,55 | 80-100 | enzimatică |
| LCR (lichid cefalorahidian) | copii | 3,05-3,89 | 55-70 | enzimatică |
| LCR (lichid cefalorahidian) | adulți | 2,22-4,22 | 40-70 | enzimatică |
| Sânge capilar | adulți | 3,33-5,50 | 60-100 | enzimatică |
| Salivă | adulți | 0,83 | -18 | enzimatică |
| Lichid sinovial | adulți | sub 0,55 | sub 10 | enzimatică |
| Lichid amniotic | adulți | 1,28-2,22 | 23-40 | enzimatică |
| Urină | adulți | 1,11-5,00 mmol/d | 20-90 mg/24 h | enzimatică |

În tabelul I.1. sunt prezentate valorile normale ale glucozei în diferite lichide biologice (după Radu Mihai Vasile, 1986).

Limitele de variație a glucozei serice înregistrează anumite trepte, fiecare cu valoare de diagnostic.

- < 60 mg/100 ml - hipoglicemie;
- 60-110 mg/100 ml - normoglicemie;
- 160-180 mg/100 ml - prag renal de eliminare;
- > 200 mg/100 ml - hiperglicemie cu diagnostic de diabet zaharat manifest;
- 400-600 mg/100 ml - comă diabetică cetoacidozică;
- > 600 mg/100 ml - comă hiperosmolară fără cetoacidoză.

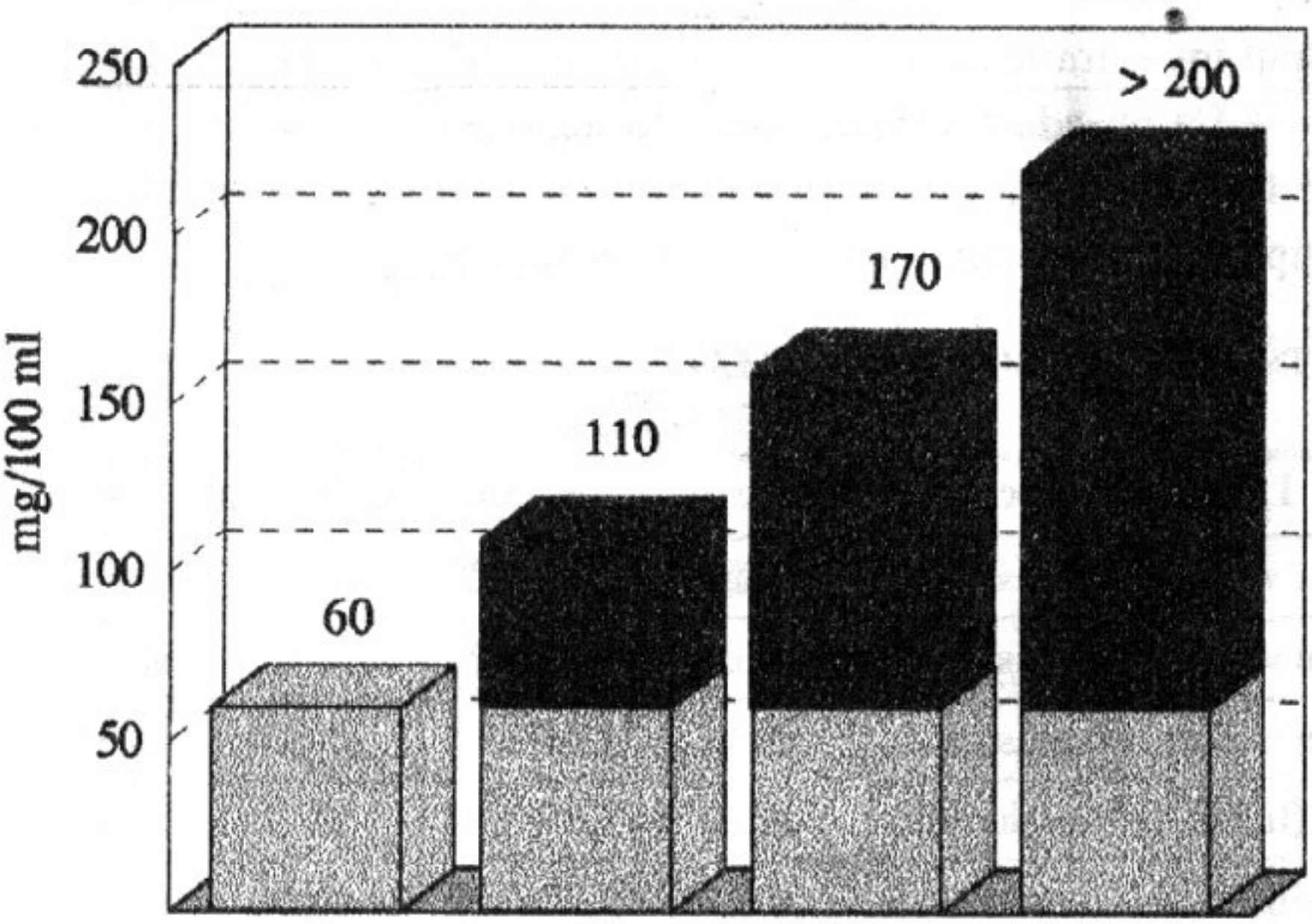



Fig.I.4. **Valorile glucozei serice și interpretarea sa diagnostică**

**Hipoglicemiile.** Starea de hipoglicemie este un sindrom clinic cu manifestări clinice predominant neuropsihice, datorat scăderii concentrației (nivelului) glucozei sanguine sub limita inferioară a valorilor normale.

Limita inferioară este apreciată pentru bărbați la 50 mg/100 ml (2,75 mmol/l), iar pentru femei la 40 mg/100 ml (2,2 mmol/l).

Ținând seama de condițiile de instalare și de factorii implicați în declanșarea hipoglicemiilor, acestea se clasifică conform tabelului I.2.

Tabelul I.2. **HIPOGLICEMII**

| I. Hipoglicemii induse medicamentos sau toxice | II. Hipoglicemii à jeun | III. Hipoglicemii postprandiale |
|---|---|---|
| • insulină;<br>• sulfonilureice;<br>• alcool;<br>• salicilaţi;<br>• chinină;<br>• β-blocante;<br>• substanţe organofosforice. | ▪ tulburări endocrine:<br>- insuficienţă corticosuprarenală;<br>- insuficienţă antehipofizară;<br>- hipotiroidism;<br>- deficit de glucagon;<br>▪ insuficienţă hepatică severă;<br>▪ insuficienţă renală terminală;<br>▪ glicogenoze;<br>▪ neoplasme extrapancreatice. | ◦ intoleranţă la fructoză galactoză;<br>◦ hipoglicemii reactive:<br>◦ după intervenţii chirurgicale gastrice;<br>◦ afecţiuni gastroduodenale;<br>- obezitate;<br>◦ diabet juvenil;<br>◦ glicogenoze. |

Tabelul I.3. **HIPERGLICEMII**

| I. Tulburări endocrine | | |
|---|---|---|
| **Boala** | **Hormonul** | **Glanda afectată** |
| • diabet zaharat | ▪ insulina | ◆ pancreasul endocrin |
| • acromegalie | ▪ STH | ◆ hipofiza |
| • sindrom Cushing | ▪ glucocorticoizi | ◆ corticosuprarenala |
| • boala lui Basedow | ▪ tiroxina | ◆ tiroida |
| • feocromocitom | ▪ catecolamine | ◆ medulosuprarenala |
| II. Cancer | ◆ suprarenală;<br>◆ pancreas;<br>◆ tiroida | |
| III. Tulburări cronice renale | | |
| IV. Tulburări cronice hepatice | | |

**Hiperglicemiile.** Reprezintă creşteri ale nivelului glucozei sanguine la valori de peste 120 mg/100 ml, datorate unui deficit absolut sau relativ de insulină (vezi tabelul I.3.).

Există hiperglicemii fiziologice:

◆ de origine adrenalinică, determinate de stări de emoţie, frig, altitudine ridicată;

◆ de origine alimentară, 1-3 ore după o alimentație bogată în glucide.

## I.3. GLUCIDE URINARE

În mod normal, urina nu conține glucide decât într-o cantitate foarte mică, de 15-150 mg/24 h, astfel încât nu pot fi dozate decât cu ajutorul reactivilor foarte sensibili.

Se poate considera că pentru organismul uman sănătos, valoarea **glucozei urinare** este **0 (zero)**.

În afară de glucoză, în condiții patologice, au fost identificate în urină fructoză, galactoză, pentoze (riboză, arabinoză, xiloză), din care cauză eliminarea unui glucid în urină este denumită **meliturie**.

Identificarea naturii glucidelor în urină se face în primul rând datorită proprietăților reducătoare ale acestora și, în al doilea rând, prin reacții specifice de diferențiere (tabelul I.4.).

Deoarece urina conține și substanțe reducătoare neglucidice, acestea sunt îndepărtate prin precipitarea lor cu reactiv **Courtonne** (acetat neutru de plumb 30%). Pentru stabilirea precisă a naturii glucidului existent în urină se folosesc reacțiile de diferențiere.

### *I.3.1. GLUCOZURIA*

Nivelul glicemiei, cât și integritatea funcțională a rinichiului sunt factorii de care depinde apariția glucozei în urină.

Creșterea concentrației glucozei peste 160-180 mg/100 ml - **pragul renal de eliminare** (vezi figura I.5.) - are drept consecință excreția renală a glucozei (glucozurie hiperglicemică) întâlnită în **diabet zaharat** și mai rar în hipertiroism sau după ingestia constant ridicată de glucide.

In cazul unor afecțiuni renale, ca rezultat al unei reabsorbții incomplete a glucozei din filtratul glomerular, apare o glucozurie normoglicemică - **glucozurie renală.**

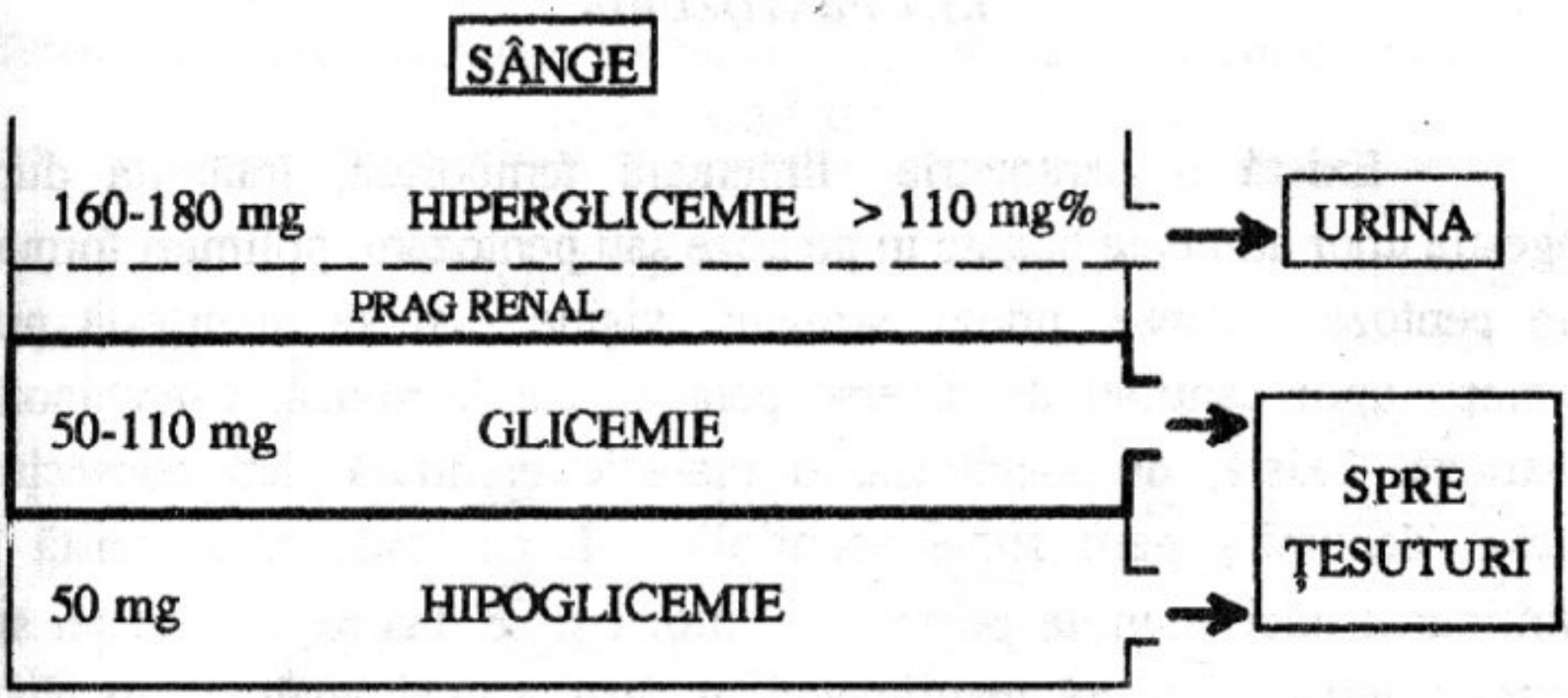



**Fig.I.5. Ilustrarea plastică a pragului renal**

### *I.3.2. FRUCTOZURIA*

Există o **fructozurie alimentară** în cazul ingestiei unor cantități mari de miere, struguri sau alte fructe bogate în fructoză și se datorește faptului că în aceste cazuri ficatul nu poate converti toată cantitatea de fructoză în glucoză.

În cazuri rare, distingem o **fructozurie esențială**, datorată unui defect genetic ce are ca urmare sinteza defectuoasă a fructokinazei hepatice, implicată în metabolismul fructozei.

### *I.3.3. GALACTOZURIA ȘI LACTOZURIA*

Se întâlnesc la femeile în stare de graviditate, în lactație sau în perioada menstruală.

Se cunoaște de asemenea o maladie congenitală - **galactozemia esențială**, însoțită de galactozurie, mai frecventă în primele zile de viață ale copilului. Aceasta se datorește absenței din ficat a enzimei galactozo-1-fosfat-uridil-transferaza, care transformă galactoza în glucoză.

### *I.3.4. PENTOZURIA*

Există o pentozurie alimentară temporară, întâlnită după ingestia unor alimente bogate în pentoze sau pentozani, polimeri formați din pentoze - cireșe, prune, struguri, vișine - și se manifestă prin excreția unor cantități de diverse pentoze ca: D-riboză, L-arabinoză, L-xiloză. Există, de asemenea, o maladie ereditară fără consecințe grave, denumită **pentozurie esențială - L-xiluloză**, care constă în eliminarea unei anumite pentoze, L-xiloza și se datorește absenței sau sintezei într-o cantitate insuficientă în ficat a unei enzime din ciclul acizilor uronici-xilitoldehidrogenaza.

În tabelul de mai jos rezumăm informațiile asupra ozelor întâlnite în urină.

Tabelul I.4. **PRINCIPALELE OZE ÎNTÂLNITE ÎN URINĂ**

| Tipul de meliturie | Reacția de identificare | Reacția de diferențiere | Stările patologice în care apar |
|---|---|---|---|
| Glucozurie | Benedict<br>Fehling | - | • diabet zaharat<br>• hipertiroidism<br>• glucozurie renală |
| Fructozurie | Seliwanoff | Seliwanoff | • fructozurie esențială |
| Galactozurie | Fehling-Barfoed | Acid mucic<br>Osazonă | • galactozurie esențială |
| Pentozurie | Fehling | Bial, Thomas | • pentozurie esențială |

## I.4. METODE DE DOZARE A GLUCOZEI ÎN SÂNGE

În laboratorul clinic dozarea glucozei se face în ser, plasmă, mai rar în sânge total și în lichid cefalorahidian. În cazurile constant hiperglicemice, precum și în unele afecțiuni renale, dozarea glucozei se practică și în urină.

În tabelul I.5. au fost sistematizate cele mai reprezentative metode, dependent de principiul de dozare.

Tabelul I.5. **CLASIFICAREA PRINCIPALELOR METODE DE DOZARE A GLUCOZEI SERICE**

| Principiul metodei | Reactivi specifici | Autori | Valorile obținute mg/100 ml sânge, ser |
|---|---|---|---|
| A. Metode de oxido-reducere | • fericianura de potasiu<br>• reactiv arseno-molibdenic<br>• fericianura de potasiu | Hagedorn-Jensen<br>Nelson-Somogyi<br>Ionescu-Matiu | 90-130<br>70-120<br>90-110 |
| B. Metode colorimetrice | • antrona<br>• anilina<br>• o-toluidina | Dreiwood<br>Lorentz<br>Hultman | 90-120<br>80-115<br>80-110 |
| C. Metode enzimatice | • glucozooxidază<br>• glucozodehidrogenază<br>• hexokinază | Huget-Nixon<br>Banausch<br>Schmidt | 70-100<br>50-100<br>65-90 |

### *I.4.1. METODE COLORIMETRICE*

Principiul metodelor colorimetrice utilizate în laboratorul clinic se bazează pe observația că glucoza, în mediu acid și la cald, se poate condensa cu compuși fenolici sau amine aromatice formând compuși colorați.

Metoda cu orto-toluidină este recomandată în prezent fiind cea mai specifică, exactă și rapidă, permițând în același timp analize de serie care se pretează la automatizare.

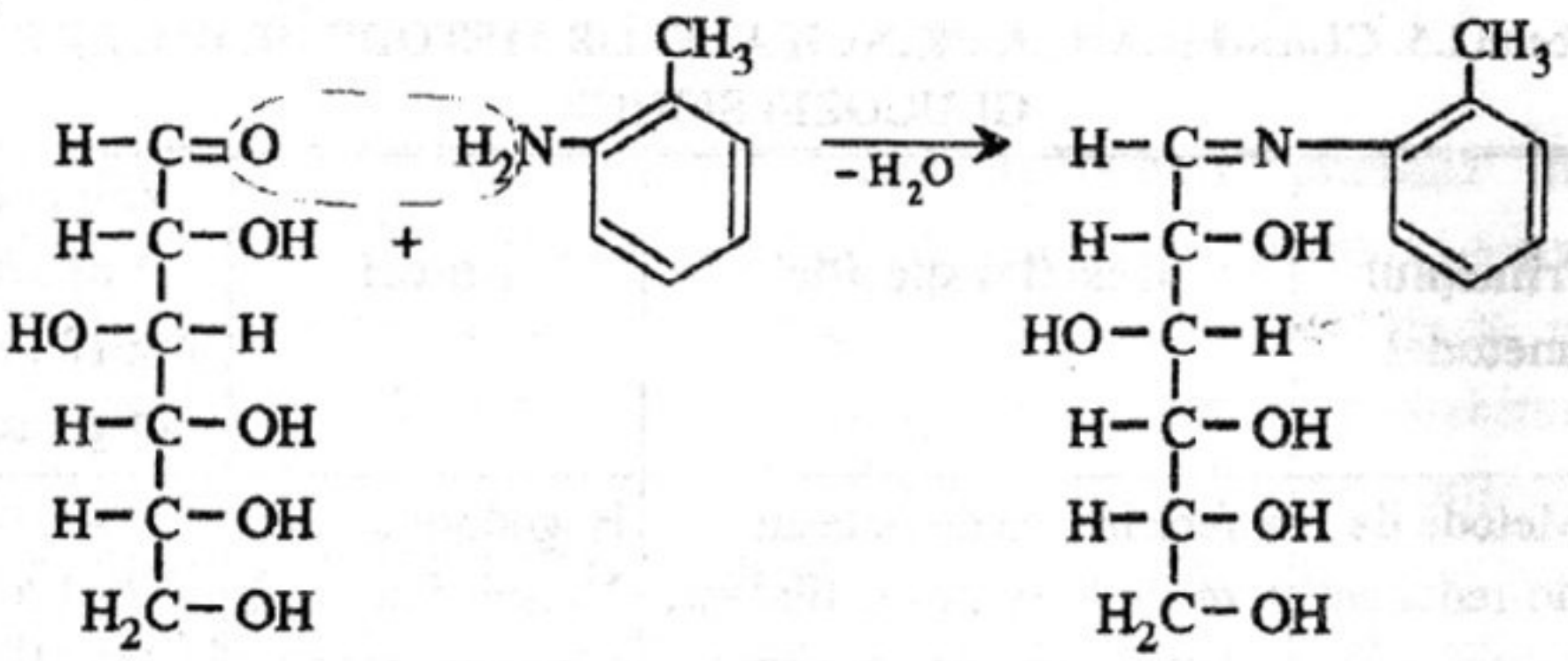
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
BIBLIOTECA CENTRALĂ MEDICINĂ
Nr. de inventar: 1652
Cotă: II 76.469
CRAIOVA

#### *I.4.1.1. METODA CU O-TOLUIDINĂ (HULTMAN)*

**Principiul metodei**

Glucoza se condensează cu o-toluidina, în mediu de acid acetic, formând un complex de culoare **verde-albastru** a cărui intensitate este proporțională cu concentrația ei.

Măsurarea extincției se face la $\lambda = 635$ nm în cuva de 1 cm.



**Reactivi**

1. Soluție de o-toluidină în mediu de acid acetic glacial și tiouree: 2 g tiouree, 60 ml apă distilată, 880 ml acid acetic, 60 ml o-toluidină notată cu $R_L$;

2. Soluție de acid tricloracetic 20%;

3. Soluție standard de glucoză 100 mg% în soluție saturată de acid benzoic notată cu S.G.

Conservare la temperaturi cuprinse între 0-25°C.

**Tehnica de lucru**

Există două posibilități de lucru. Una în care se efectuează o deproteinizare prealabilă (a) și cea fără deproteinizare (când avem în lucru o probă de ser sau plasmă perfect limpede, neicterică sau nehemolizată), (b).

a) **Schema de lucru cu deproteinizare:**

Se pipetează în eprubete de centrifugă probele P și standardul S.

| Reactivi | | P | S |
|---|---|---|---|
| Apă distilată | ml | 1,5 | 1,5 |
| Ser, plasmă | ml | 0,2 | - |
| Standard glucoză SG | ml | - | 0,2 |
| Acid tricloracetic 20% | ml | 2,5 | 0,5 |

Se amestecă și se centrifughează 5 minute la 3000 rotații/min. Se continuă lucrul folosind supernatantul:

| Reactivi | | P | S | Blanc |
|---|---|---|---|---|
| Supernatant probă | ml | 0,5 | - | - |
| Supernatant standard | ml | - | 0,5 | - |
| Acid tricloracetic 5% | ml | - | - | 0,5 |
| o-toluidină ($R_L$) | ml | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

Se amestecă și se ține în baie la fierbere 8 minute. Se răcește și se măsoară extincția probei și standardului față de blanc la 635 nm, în cuvă de 1 cm.

b) **Schema de lucru fără deproteinizare**

Se pipetează în eprubete fără a face deproteinizarea astfel:

| Reactivi | | P | S | Blanc |
|---|---|---|---|---|
| Ser sau plasmă | ml | 0,1 | - | - |
| Standard | ml | - | 0,1 | - |
| o-toluidină ($R_L$) | ml | 3,0 | 3,0 | 3,1 |

Se amestecă și se ține în baie la fierbere 8 minute. Se răcește și se măsoară extincțiile probei Ep și a standardului Es față de blanc la $\lambda$ = 635 nm în cuva de 1 cm.

**Calcul**

$$Cp = \text{mg glucoză/100 ml} = \frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \times 100; \text{ unde:}$$

$E_P$ - extincția probei; $E_B$ - extincția blancului;

Es - extincția standardului;

100 - reprezintă concentrația standardului.

**Valori normale:** 60-110 mg/100 ml.

**Observații:** Metoda se poate folosi și pentru dozarea glucozei în urină și lichid cefalorahidian.

Determinările trebuie făcute pe medii biologice proaspete.

**Aparatura folosită:** Spectrocolorimetrul Spekol.

**Notă:** Este necesar să se știe că această metodă nu este nici ea strict specifică, deși prezintă un grad mai mare de specificitate decât cele titrimetrice.

Fructoza, manoza, galactoza și pentozele dau produși colorați identici cu cel format de glucoză.

Deoarece aceste oze se întâlnesc în sânge, în mod normal, în cantități reduse, această lipsă riguroasă de specificitate nu limitează valoarea acestei metode (vezi tabelul I.6.).

Tabelul I.6. **SPECIFICITATEA METODEI CU O-TOLUIDINĂ**

| Oza | Absorbție relativă % |
|---|---|
| Glucoza | 100 |
| Fructoza | 6 |
| Manoza | 96 |
| Galactoza | 142 |
| Zaharoza | 16 |
| Lactoza | 39 |
| Xiloza | 12 |

### *I.4.2. METODE ENZIMATICE*

Metodele enzimatice prezintă gradul cel mai mare de specificitate, pentru dozare acestea necesitând preparate enzimatice pure: **glucozooxidaza, peroxidaza, hexokinaza, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza.** Aceste metode sunt rapide și se pretează la automatizare putând fi livrate în truse kit.

#### *I.4.2.1. METODA ENZIMATICĂ FĂRĂ DEPROTEINIZARE*

**Principiu**

Metoda este complet enzimatică, utilizând două enzime: hexokinază și glucozo-6-fosfat dehidrogenază, conform reacției:

$$\text{Glucoză} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinază}} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^{+} \xrightarrow{\text{G6-PD}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^{+}$$

**Probe:** sânge, ser, plasmă, urină.

Determinările în sânge și ser trebuie făcute în decurs de 1 oră de la recoltare. În plasmă, dacă recoltarea a fost făcută pe anticoagulanți glicolitici (NaF, KF), proba poate fi conservată timp de 24 de ore la 15-25ºC.

**Reactivi**

1. Tampon (trietanolamină, $Mg^{++}$);
2. Enzimă/Coenzimă (Hexokinază, G6P-DH, ATP, $NADP^{+}$);
3. Standard glucoză 100 mg/dl.

**Tehnica de lucru**

| Reactivi | | Probă | Blanc probe | Blanc reactivi | Standard |
|---|---|---|---|---|---|
| Probă | µl | 20 | 20 | - | - |
| Standard | µl | - | - | - | 20 |
| NaCl 0,9% | µl | - | 2000 | - | - |
| Reactiv 1+2 (preparat conform prospectului) | µl | 2000 | - | 2000 | 2000 |

Se amestecă, se incubează 10-15 minute la 20-25ºC sau 5 minute la 37ºC. Se măsoară absorbanța probei, a blancului de probe și a standardului față de blancul reactivilor, în decurs de 30 de minute, în cuva de 1 cm și la $\lambda = 340$ nm sau 365 nm.

**Calcul**

$$\text{mg/dl glucoză} = \frac{E_P}{E_S} \text{ x concentrația standard}$$

Testul este liniar până la o concentrație în glucoză de 500 mg/dl.

**Valori de referință**

Sânge: 65-95 mg/dl; 3,6-5,3 mmol/l.

Ser, plasmă: 70-105 mg/dl; 3,9-5,8 mmol/l.

Urină: 0-20 mg/dl; 0,1-1 mmol/l.

### *I.4.2.2. METODA ENZIMATICĂ CU HEXOKINAZĂ (CU DEPROTEINIZARE)*

**Principiu** Identic cu cel de la metoda fără deproteinizare.

**Recoltarea și conservarea probelor:** identic ca la metoda fără deproteinizare.

**Deproteinizarea**

Se pipetează într-o eprubetă de centrifugă 1 ml soluție deproteinizantă (soluție acid percloric 0,33 mol/l) și se adaugă 0,1 ml probă. Se clătește pipeta în această mixtură de câteva ori. Se centrifughează.

Supernatantul poate fi conservat timp de 7 zile la +2 -8°C într-o eprubetă cu dop.

**Tehnica de lucru**

| Reactivi | Martor | Probă |
|---|---|---|
| Supernatant | - | 0,1 |
| Reactiv 1+2 (preparat conform prospectului) | 2 | 2 |
| Soluție deproteinizantă | 0,1 | - |

Se amestecă și se incubează 10-15 minute la 20-25°C, apoi se măsoară extincția probei față de martor, în cuva de 1 cm la $\lambda = 365$ nm sau 340 nm.

**Calcul**

$$\text{mg glucoză/100 ml} = \frac{Ep}{Es} \text{ x concentrația standard}$$

Testul este liniar până la o concentrație a glucozei de 1000 mg/dl.

**Valori normale:** 70-120 mg/100 ml ser. Metoda cu o-toluidină: 65-110 mg/100 ml ser.

**Variații patologice**

- hiperglicemii: diabet zaharat de origine pancreatică, hipofizară, suprarenală, tiroidiană, în accidente cerebrovasculare, infecții, tumori;

• hipoglicemie: după administrări de doze mari de insulină, insulinom, glicogenoze, insuficiență tiroidiană, insuficiență adenohipofizară, insuficiență corticosuprarenală (Addison).

## I.5. DIAGNOSTICUL DIABETULUI ZAHARAT

În Tratatul de Medicină Lancereaux-Paulescu editat la Paris (1912), această afecțiune era descrisă astfel:

"*In absența secreției interne a pancreasului, glucoza ne mai fiind asimilată, nu mai este nici depozitată sub formă de glicogen, nici consumată de către țesuturi.*

*Ea se acumulează în sânge (**hiperglicemie**), produce efecte osmotice (**deshidratarea țesuturilor**, polidipsie) și neputând fi utilizată (**slăbire, azoturie, polifagie**) este eliminată prin urină (**glucozurie**) ca o substanță exogenă*".

Pentru precizarea tulburărilor localizate în metabolismul glucidic, nivelul glicemiei constituie un indicator prețios dar insuficient.

Aceasta a făcut să fie elaborate o serie de probe dinamice, destinate a evidenția o creștere a glicemiei și care traduce de fapt un deficit al homeostazei glucidice. Cele mai utilizate probe pentru diagnosticul diabetului zaharat sunt:

- glicemia "à jeun";
- testul oral de toleranță la glucoză;
- hiperglicemia provocată pe cale intravenoasă;
- determinarea hemoglobinei glicozilate.

### *I.5.1. GLICEMIA A JÉUN*

Determinarea glicemiei în plasmă dă o valoare cu 15% mai mare decât în sângele integral. Diferența se datorește faptului că aproximativ 40% din volumul sângelui este ocupat de hematii. Numai 85% din volumul folosit pentru determinare conține glucoză, în timp ce valoarea obținută este raportată la întregul volum.

Sângele arterial are o concentrație de glucoză mai mare decât sângele venos sau capilar. Valoarea mai mică a glucozei în sângele

venos se datorește faptului că în țesuturi o parte din glucoză este consumată. Sângele recoltat din deget sau din lobul urechii reprezintă un amestec de sânge arterial și venos.

Probele de sânge pentru determinarea glicemiei "à jeun" sunt recoltate după minimum 8 ore de post, preferabil după 14 ore.

Dacă glicemia à jeun a crescut constant în timp, (80, 90, 100, 110 mg/dl), aceasta indică cu certitudine evoluția către diabetul zaharat clinic manifest.

### *I.5.2. TESTUL ORAL DE TOLERANȚĂ LA GLUCOZĂ*

Pentru interpretarea corectă a acestei probe (hiperglicemia provocată) este necesar a fi respectate o serie de condiții:

- pacientul nu trebuie să fi avut nici o afecțiune acută timp de 15 zile;
- testul se efectuează după ce pacientul a păstrat un regim alimentar cu maxim 150 g glucide pe zi timp de 3 zile;
- este necesară o activitate fizică normală;
- este interzis consumul de cafea, tutun și alcool;
- în timpul executării probei, pacientul va păstra un repaus fizic, fără stress, cafea și alcool.

**Tehnica de lucru**

- proba orală de încărcare la glucoză se efectuează dimineața, după golirea vezicii urinare;
- se recoltează sânge "à jeun" în scopul determinării glicemiei inițiale (momentul zero);
- se administrează pe cale orală în 5-10 minute, 100 g glucoză dizolvată în circa 200-300 ml apă rece;
- pentru a se evita senzația de greață se adaugă câteva picături de zeamă de lămâie;
- se recoltează apoi sânge din 30 în 30 de minute timp de 4 ore;
- în paralel se recoltează și probe de urină;

► dacă în urina recoltată se găsește glucoză se procedează la dozarea ei, iar pacientului i se va recolta urina din tot restul zilei și nopții (urina de 24 h), în scopul determinării glicozuriei.

**Interpretarea rezultatelor**

I. La un subiect normal, curba prezintă o ascendență rapidă ajungând la un maximum de 150 mg/100 ml după aproximativ o oră. Apare o hipoglicemie tranzitorie după circa 2 h.

Valoarea glicemiei scade pentru ca apoi să ajungă la valori normale după 2-3 ore.

II. La un subiect diabetic, creșterea inițială (hiperglicemia) este superioară unui subiect normal după 1 oră.

Revenirea la valoarea inițială se face foarte lent fără starea de hipoglicemie tranzitorie.

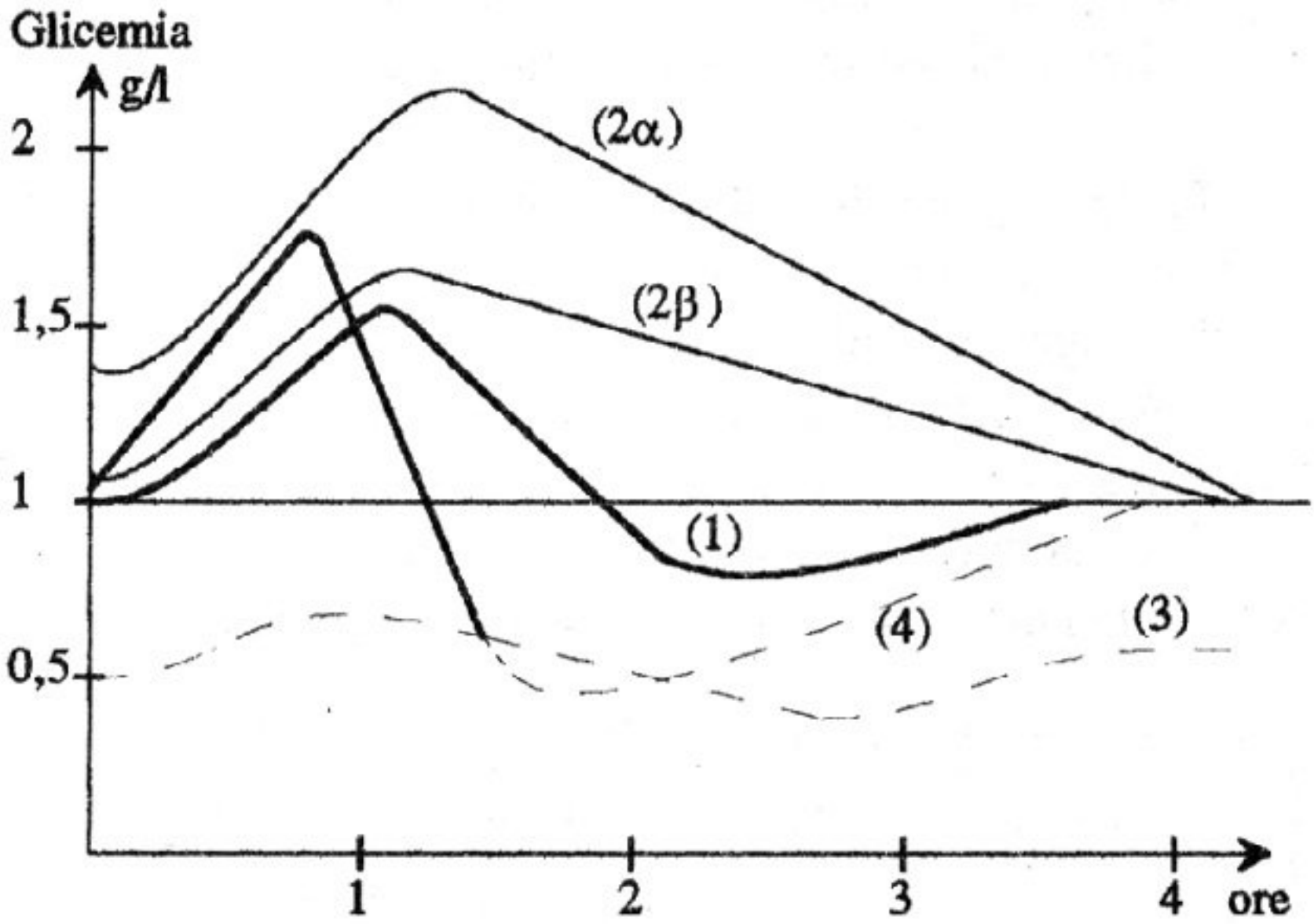



Fig.I.6. **Proba hiperglicemiei provocate**

1 - normal; 2α - diabetic; 2β - diabetic latent;

3 - hipoglicemie; 4 - "sindromul dumping"

III. La un subiect cu **diabet latent,** valoarea inițială apare ca normală sau subnormală, dar creșterea glicemiei este superioară aceleia produsă la subiectul normal, iar revenirea la valorile normale se face lent după circa 3-4 ore.

IV. La un subiect hipoglicemic, se observă o creștere ușoară a glicemiei și o revenire la valorile normale inițiale.

V. La un subiect care prezintă "sindromul dumping", hiperglicemia este rapidă după care, la circa 1 oră, scăderea hipoglicemiei este bruscă și mai profundă. După aproximativ 4 ore, glicemia revine la valori normale.

### *I.5.3. DETERMINAREA PROTEINELOR GLICOZILATE*

Un indicator prețios al hiperglicemiei cronice este reprezentat de proteinele glicozilate. Introdusă în practica medicală numai în ultimele 2 decenii, determinarea hemoglobinei glicozilate a marcat unul dintre cele mai importante progrese din domeniul diabetologiei.

În condiții de hiperglicemie, moleculele proteice suferă un proces de glicozilare neenzimatică, proporțional cu mărirea nivelului glicemiei.

Procesul glicozilării hemoglobinei are loc lent, dar continuu, pe tot parcursul vieții eritrocitelor.

Hemoglobina glicozilată cuprinde mai multe subfracțiuni, denumite: A1a, A1b, A1c, corespunzând ritmului lor de migrare cromatografică.

În condiții de **normoglicemie**, fracțiunile Hb A1a-b reprezintă circa 2%, iar fracțiunea A1c circa 5-6% din hemoglobina totală.

Tabelul I.7. **NIVELUL HEMOGLOBINEI GLICOZILATE HbA1c**

| Nr. | Valoarea HbA1c | Interpretarea metabolică |
|---|---|---|
| 1 | 5-7% | Control metabolic foarte bun |
| 2 | 7-8,5% | Control metabolic acceptabil |
| 3 | 8,5-10% | Control metabolic suboptimal |
| 4 | 10-12% | Pacient dezechilibrat |
| 5 | 12-15% | Dezechilibru metabolic major |

Valoarea normală a hemoglobinei A (care cuprinde toate fracțiunile) este de circa 8%; pentru Hb A1c este de circa 6%.

Din figura I.7. rezultă criteriile de control metabolic în funcție de valoarea Hb A1c care poate varia între **6%** (control metabolic foarte bun) și peste **15%** (dezechilibru metabolic major).

Valoarea practică a determinării Hb glicozilate constă în posibilitatea obținerii unei informații valoroase privind **controlul pe termen lung** al diabetului, corespunzând duratei medii de supraviețuire a eritrocitelor de 90-120 zile - memoria diabetică de lungă durată.

Determinarea Hb glicozilate a fost ocazional folosită pentru încadrarea corespunzătoare a cazurilor, prezentând "toleranță alterată la glucoză", care pot evolua către diabet, iar alteori către normalizare.

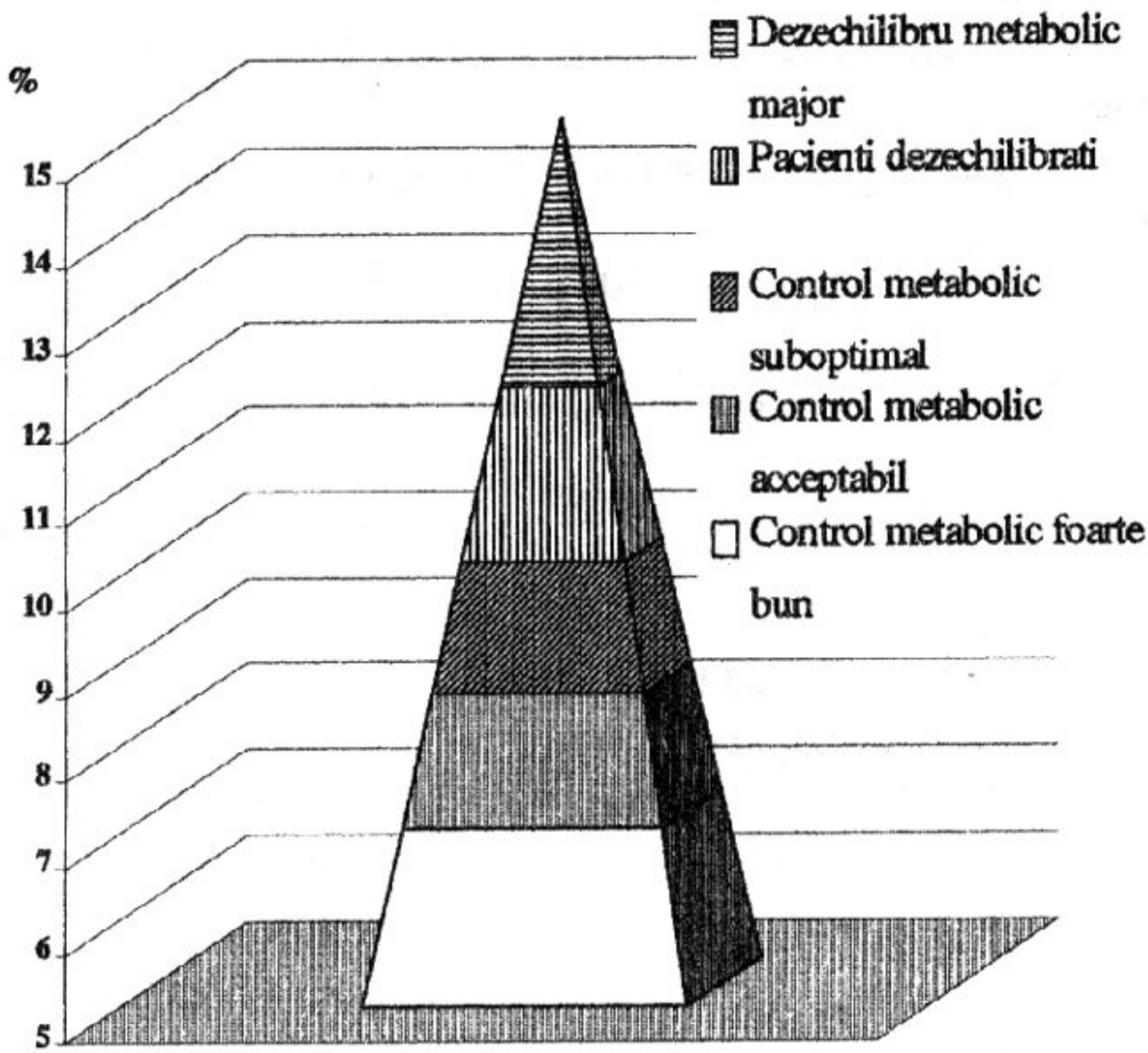



Fig.I.7. **Nivelul hemoglobinei glicozilate.**
**Criteriu de control metabolic al diabetului zaharat**

### *I.5.4. TESTE RAPIDE*

Deoarece diabetul zaharat, o tulburare metabolică cronică, afectează un număr din ce în ce mai mare de persoane în toate țările lumii, s-au pus la punct teste rapide care să permită monitorizarea lor la domiciliu pentru a se putea urmări eficacitatea tratamentului, precum și evoluția bolii.

În prezent aceste teste sunt mult utilizate, având marele avantaj de a se efectua **rapid** și **simplu**, calități care compensează faptul că sunt semicantitative și mai puțin specifice.

Cele mai utile teste sunt cele impregnate cu **enzime**:

- GOD (glucozoxidaza EC1.1.3.4.);
- POD (peroxidaza EC1.1.1.7.)

și un **cromogen** care poate fi:

- o-toluidină, care prin oxidare formează albastru de toluidină;
- galbenul de tartrazină, care prin oxidare se colorează în verde.

Principiul acestor teste este rezumat în ecuațiile de mai jos:

$$\beta\text{–D–Glucoză} + O_2 \xrightarrow{GOD} \beta\text{–Gluconolactonă} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + CRG\text{–}H_2 \xrightarrow{POD} 2H_2O + CRG$$

în care:

* GOD - glucozoxidaza;
* POD - peroxidaza din hrean;
* CRG, CRG–$H_2$ - cromogen în formă oxidată și redusă.

În general compararea cu scala de evaluare a testului se face după o imersie de circa 10 secunde în plasmă sau urină.

### *I.5.5. UTILIZAREA APARATULUI INDIVIDUAL Accu-Chek-Easy*

Pentru verificarea individuală a nivelului glicemiei se utilizează o serie de aparate, care permit determinarea rapidă a acestei constante biologice.

Dintre aparatele destinate acestui scop menționăm Accu-Chek-Easy, fabricat de firma Boehringer Mannheim din Germania.

Schema aparatului este prezentată în figura I.8. cu precizarea principalelor componente ale acestuia.




Fig.I.8. **Aparatul Accu-Chek-Easy**

1. **Tasta pornit/oprit**

Apăsați pentru a porni sau opri aparatul.

2. **Display**

Arată rezultatul testului în lucru, mesaje și până la 30 de rezultate din memorie.

3. **Fanta pentru introducerea chip-ului de codificare**

În acest loc introduceți **chip**-ul de codificare.

4. **Chip-ul de codificare EasyKey**

Acest chip îl primiți în fiecare cutie cu bandelete.

5. **Locul de introducere a bandeletei de testare**

În acest loc introduceți bandeleta de testare.

6. **Tasta pentru memorie**

Apăsați această tastă pentru a afișa rezultatele testelor din memorie.

7. **Capacul bateriilor**

Ridicați acest capac pentru a schimba bateriile uzate.

## Instrucțiuni înaintea testării

***Informații cheie***

Întotdeauna: folosiți numai bandeletele EasyTest.

- acoperiți imediat cutia după scoaterea bandeletelor, protejând astfel pe cele rămase de lumină și grăsimi;
- asigurați-vă că numărul de cod afișat corespunde cu cel al bandeletei de testare folosite;
- când utilizați bandeleta, aplicați o picătură mică de sânge în centrul ariei de testare. Așteptați până când aria de testare nu mai lucește (5 secunde), înainte de a introduce bandeleta în aparat (aceasta înseamnă că picătura este absorbită în întregime);
- introduceți complet în aparat bandeleta de testare;
- introduceți bandeleta în aparat în maximum 30 de secunde după aplicarea de sânge pe bandeletă;
- păstrați bandeletele la o temperatură în toleranța admisă (+18ºC – +32ºC). Nu folosiți bandelete care au fost expuse la alte temperaturi;
- păstrați aparatul la o temperatură în toleranța admisă (+18ºC – +32ºC). Înaintea testării lăsați aparatul să se adapteze la temperatura camerei, dacă a fost păstrat la temperaturi neadmise;
- păstrați aparatul și locul de introducere a bandeletelor curate asigurându-vă de acest lucru înaintea testării. Vezi "Curățirea aparatului". Efectuați un test de rutină pentru a verifica performanța bandeletei de testare și a aparatului. Vezi "Verificarea performanțelor

aparatului". În timpul transportului și conservării aparatului păstrați chip-ul de codificare EasyKey în aparat.

**A se evita!**

- conservarea bandeletelor de testare sau a aparatului într-o zonă cu umiditate crescută;
- testarea în condiții de umiditate crescută;
- testarea în lumina directă a soarelui;
- folosirea bandeletelor și a soluțiilor de control expirate;
- deteriorarea bandeletelor;
- folosirea bandeletelor decolorate;
- introducerea unui corp străin în locul de introducere a bandeletelor de testare sau în fanta chip-ului de codificare EasyKey;
- introducerea sau îndepărtarea chip-ului EasyKey în timpul funcționării aparatului;
- folosirea aparatului în apropierea unor surse de radiații electromagnetice cum ar fi: cuptoare cu microunde, telefoane celulare sau stații de emisie radio-TV;
- testarea probelor de sânge venos cu sistemul Easy.

# II EXPLORAREA METABOLISMULUI LIPIDIC

## II.1. CONSIDERAȚII TEORETICE

Componente de bază ale organismului, **lipidele** se caracterizează printr-un grad mare de **insolubilitate în apă** și o **solubilitate** crescută în diferiți **solvenți nepolari** cu ajutorul cărora pot fi extrase și separate pentru a fi analizate. Rolurile biologice ale lipidelor sunt variate:

- rol energetic - acizii grași;
- rol structural - fosfolipidele, colesterolul;
- rol în finalizarea și controlul proceselor fiziologice - vitaminele liposolubile, derivații colesterolului: hormonii steroizi, sărurile biliare etc.

Având un grad mare de insolubilitate, lipidele sunt menținute în mediul apos al plasmei, prin formarea unor complexe solubile cu anumite proteine denumite apolipoproteine sau apoproteine.

Din acest motiv, în ultimii ani, investigarea completă a metabolismului lipidic implică determinări de laborator referitoare la aceste complexe lipoproteice - **lipoproteinele.**

Studiile experimentale, precum și observațiile clinice și de laborator au confirmat faptul că unele anomalii ale lipoproteinelor plasmatice sunt însoțite de acumularea esterilor de colesterol și a altor lipide în țesutul conjunctiv al pereților arterelor și dezvoltarea precoce a bolilor cardiovasculare și aterosclerozei, două din principalele cauze ale mortalității.

În laboratorul clinic, analiza lipoproteinelor este însoțită de dozări ale:

- lipidelor totale;
- colesterolului;
- triacilglicerolilor.

## II.2. STRUCTURA LIPOPROTEINELOR

Lipoproteinele sunt, de regulă, particule sferice având la suprafață componente cu grupări polare hidrofile: apoproteine, fosfolipide și colesterol liber, iar în centru componente cu un caracter hidrofob: triacilgliceroli și esteri ai colesterolului.

Ele asigură solubilizarea și transportul lipidelor prin mediul apos al plasmei.

Deși toate lipoproteinele plasmatice conțin atât proteine cât și diferite componente lipidice, ele se deosebesc prin:

- natura apoproteinelor din compoziția lor;
- raportul între proteine și lipide;
- raportul între diferitele componente lipidice.

Diferențele structurale dintre lipoproteine determină deosebirile între anumite proprietăți fizico-chimice cum sunt:

- densitatea lipoproteinelor;
- mobilitatea electroforetică.

Separarea diferitelor lipoproteine, precum și denumirea claselor de lipoproteine se face pe baza comportării acestora la ultracentrifugare și electroforeză.

## II.3. CLASELE DE LIPOPROTEINE

Prin ultracentrifugarea în gradient de densitate a plasmei s-au separat patru fracțiuni lipoproteice majore:

- **chilomicronii**, particulele cu densitatea cea mai mică (vezi tabelul II.1.), prezenți în sânge imediat după o dietă bogată în grăsimi sau în condiții patologice; aceștia conțin **triacilglicerolii exogeni** absorbiți de alimente.
- **lipoproteine cu densitate foarte mică** (VLDL = very low density lipoproteins) care transportă în proporție mai mare **triacilglicerolii sintetizați** în organism.
- **lipoproteine cu densitate mică** (LDL = low density lipoproteins) care transportă în cantitate mai mare **colesterol** de la ficat la țesuturi.

◆ **lipoproteine cu densitate mare** (HDL = high density lipoproteins) care se separă în eprubeta de centrifugă în zona cu densitatea cea mai mare și transportă cantități semnificative de **colesterol** de la țesuturi la ficat.

Ultracentrifugarea este o metodă de lungă durată ce nu poate fi realizată în analizele de serie. De aceea, se folosește separarea prin electroforeză.

Electroforeza realizează o separare mai rapidă, suficient de selectivă a claselor de lipoproteine pe baza încărcării electrice diferite a acestora.

Prin electroforeza în gel de agaroză a lipoproteinelor se separă patru clase:

- chilomicronii care rămân pe linia de start, având un conținut redus de proteine (vezi tabelul II.1.);
- β-lipoproteinele (corespunzând lui LDL), care migrează în zona β-globulinelor serice;
- pre β-lipoproteinele ce reprezintă VLDL și migrează în fața β-lipoproteinelor;
- α-lipoproteinele, corespunzătoare lui HDL, care migrează în zona α-globulinelor serice.

În anumite situații patologice se pot separa fracțiuni lipoproteice minore care permit completarea unui diagnostic: lipoproteina X (Lp X) în cazurile de colestază hepatică, lipoproteina a (Lp a).

Diferitele afecțiuni datorate unor modificări ale metabolismului lipidic sunt însoțite și de tulburări ale metabolismului lipoproteinelor.

Pentru practica medicală, creșterea nivelului plasmatic al lipoproteinelor, respectiv hiperlipoproteinemiile, prezintă o importanță majoră.

Tabelul II.1. **CARACTERISTICILE LIPOPROTEINELOR NORMALE**

| Clasa de lipoproteine | Densitatea (g/ml) | Mobilitate electroforetică | Compoziția (%) relativă | | | | | Apoproteina majoră |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Triacilgliceroli | Colesterol liber | Colesterol esterificat | Fosfolipide | Proteine | |
| Chilomicroni | 0,94 | nu migrează | 85-95 | 1-3 | 2-4 | 3-6 | 1-2 | AI, B48 |
| Lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL) | 0,94-1,006 | pre β | 50-65 | 4-8 | 12-22 | 15-20 | 6-10 | B100, CII, CIII |
| Lipoproteine cu densitate mică (LDL) | 1,006-1,063 | β | 4-8 | 6-8 | 45-50 | 18-24 | 18-22 | B100 |
| Lipoproteine cu densitate mare (HDL) | 1,063-1,21 | α | 2-7 | 3-5 | 15-20 | 26-32 | 45-55 | AII, E |

Tabelul II.2. **CARACTERISTICILE TIPURILOR DE HIPERLIPOPROTEINEMII** (după Fredrickson, citat de I. Mincu)

| Caracteristici | Tip de hiperlipoproteinemie (HLP) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | IIa | IIb | III | IV | V |
| Aspectul plasmei | cremos | clar | clar/opalescent | opalescent | lactescent | lactescent cremos |
| Colesterol | normal sau crescut | intens crescut | crescut | crescut | normal sau ușor crescut | ușor crescut |
| Triacilgliceroli | crescut | normal | crescut | intens crescut | intens crescut | intens crescut |
| Lipoproteine crescute | chilomicroni | LDL | LDL, VLDL | prezența benzii prebeta late | LDL, VLDL | chilomicroni VLDL |
| Incidența în funcție de vârstă | copii | tineri/adulți | tineri/adulți | adulți | adulți | adulți |
| Risc pentru ateroscleroză | mic | mare | foarte mare | mare | foarte mare | mic |

Studiile lui Fredrickson și colaboratorii (1967) au dus la definirea a cinci tipuri de hiperlipoproteinemii, în funcție de modificările calitative și cantitative dintre fracțiunile lipoproteice și de aspectul plasmei păstrate 24 h la 4ºC.

Tabelul II.2. prezintă cele cinci tipuri de hiperlipoproteinemii și caracteristicile lor.

Corespondența dintre fracțiunile separate pe baza densității și cele obținute prin electroforeză nu este respectată întotdeauna. La 10-20% din subiecții normo sau hiperglicemici s-a observat creșterea unei benzi pre β care, având densitatea mai mare decât VLDL, nu flotează, ci sedimentează. Aceasta a fost denumită "pre β lipoproteina care se scufundă" sau Lp(a). În cazurile de colestază extrahepatică apare lipoproteina X (LpX). Aceasta migrează la electroforeză în agaroză după fracțiunea β. Conține cantități mari de colesterol liber, fosfolipide și apoproteină C.

Apariția lipoproteinelor Lp X, Lp(a) a căror importanță nu este pe deplin cunoscută, duce la obținerea unui aspect diferit al lipidogramei ce nu se încadrează în cele cinci tipuri.

În laboratorul clinic se pot depista și cazuri de hipolipoproteinemie sau de anomalii în compoziția lipoproteinelor care pot să prezinte interes pentru patologie. Mai importante sunt hipobeta lipoproteinemiile și hipoalfa lipoproteinemiile.

## II.4. SEPARAREA LIPOPROTEINELOR PLASMATICE ÎN GEL DE AGAROZĂ (LIPIDOGRAMA)

**Materiale necesare**

1) Tampon veronal - medinal pH = 8,6, μ = 0,05
- 10,3 g veronal sodic (medinal);
- 1,84 g veronal.

2) Agaroză 0,6% în tampon veronal: apă distilată 1:1, μ = 0,025.

3) Fixator: 10 g acid tricloracetic în acid acetic 5%.

4) Soluție de colorare: negru de sudan 0,1% sau roșu de sudan 0,1%.

**Tehnica de lucru:**

***Prepararea gelului de agaroză***

Se pregătește o soluție de agaroză 0,6% în tampon veronal (μ = 0,025) și se încălzește pe baie de apă până la dizolvarea completă a agarozei. Se aplică pe lamele de microscop aproximativ 3 ml soluție de agaroză caldă. Se lasă să se întărească circa 10-20 minute.

***Aplicarea probelor***

Cu un tăietor metalic se face un șanț la o distanță de 1,5-2 cm de marginea lamei, în care se vor pune 0,3-0,4 μl plasmă cu ajutorul unei pipete Pasteur.

***Migrarea probelor***

Se așează lamele de microscop pe cuvele de electroforeză în care s-au introdus electrozii și au fost umplute cu tampon veronal. La capetele fiecărei lame se aplică punți de hârtie Whatman umectată cu tampon. Se calculează intensitatea între 3-5 mA/placă și se lasă 75-90 minute pentru migrare.

***Fixarea***

După migrarea corectă se oprește aparatul, se scot lamele și se introduc 15-20 minute în soluție fixatoare. Se scot și se usucă peste noapte între două bucăți de hârtie de filtru umectate cu apă distilată.

***Colorarea***

Se colorează timp de 2 ore într-o baie de colorant Sudan Black sau Sudan Red. Se spală sub jet de apă. Benzile separate și colorate se vizualizează pe un fond alb.

***Densitometrarea***

Pentru evaluarea calitativă și cantitativă, lamele cu gelul uscat în care se evidențiază fracțiunile separate se introduc într-un densitometru special pentru aceste interpretări.

Fracțiunile separate pe lipidograma unui ser normal recoltat după masă sunt prezentate în figura II.1.

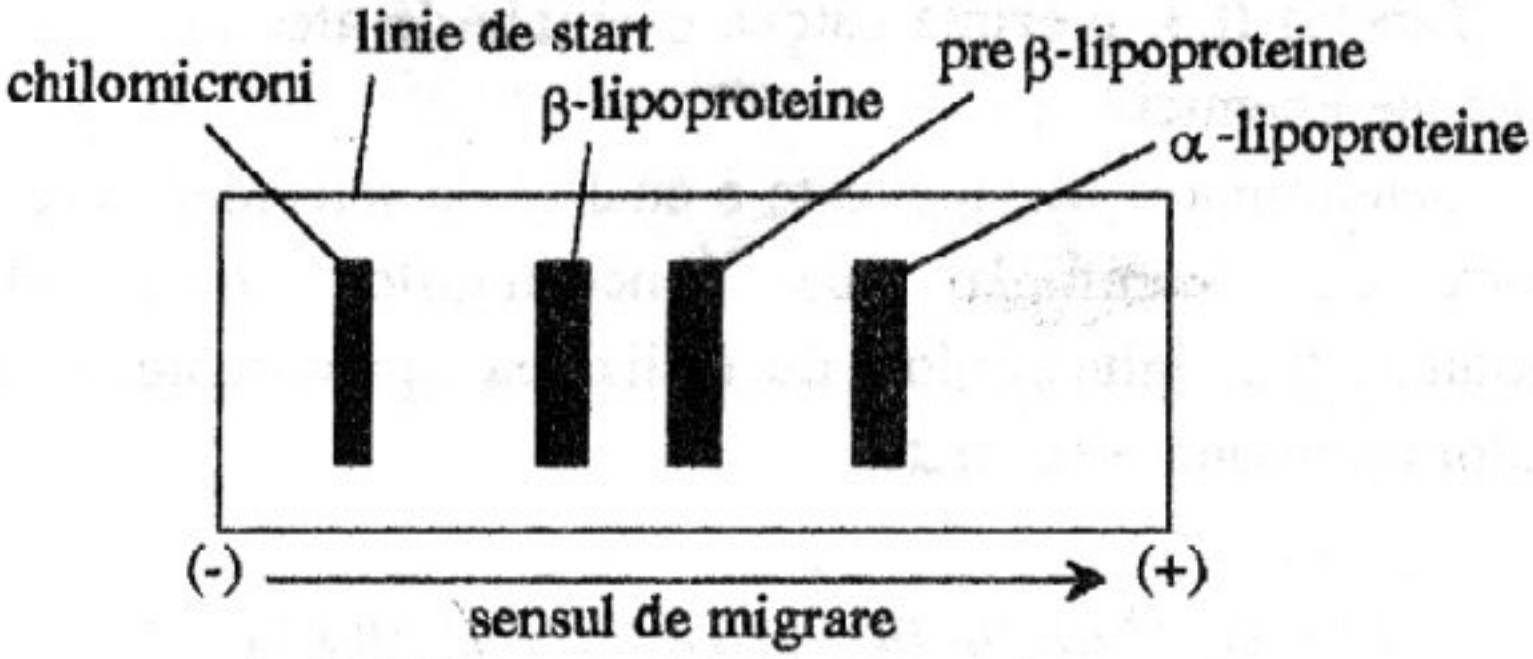



Fig.II.1. **Fracțiunile lipoproteice majore**

La analiza unui ser normal à jeun (pe nemâncate), la linia de start nu se mai observă banda pentru chilomicroni, aceştia fiind absenți.

Valorile normale: α-lipoproteine 30%
pre β + β-lipoproteine 70%

## II.5. LIPIDELE TOTALE (LIPEMIA)

Prin lipemie se înțelege valoarea de ansamblu a tuturor lipidelor plasmatice, deci suma concentrațiilor **colesterolului, triacilglicerolilor, fosfolipidelor, acizilor graşi liberi**, precum şi a celorlalte componente de natură lipidică (hormoni steroizi, vitamine A şi D, săruri biliare) care se află în cantități mult mai mici.

Tabelul II.3. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE LIPEMIEI**

| Hiperlipemie | Hipolipemie |
|---|---|
| Ateroscleroză | Anemie |
| Hiperlipemie esențială | Hipertiroidism |
| Hipotiroidism | Infecții acute |
| Insuficiență renală | Necroză hepatică |
| Diabet zaharat | |

Valoarea normală a lipemiei este cuprinsă între 400-700 mg/100 ml plasmă.

Variațiile fiziologice ale lipemiei sunt în funcție de următorii factori: vârstă, sex, alimentație, echilibru neuroendocrin, climă.

Tabelul II.3. prezintă câteva exemple de afecțiuni însoțite de modificări ale lipemiei.

Determinarea lipemiei este o analiză de screening care trebuie confirmată de determinări ale concentrațiilor individuale ale colesterolului, triacilglicerolilor, de realizarea lipidogramei și analiza fracțiunilor lipoproteice separate.

### *II.5.1. METODE DE DOZARE A LIPIDELOR TOTALE*

Pentru dozarea lipidelor totale plasmatice în laborator au fost folosite diferite metode:

- gravimetrice (metoda Folch și Bloor);
- titrimetrice;
- cromatografice;
- turbidimetrice;
- colorimetrice.

Primele trei categorii de metode presupun extragerea lipidelor din plasmă în amestecuri de solvenți: unul polar ce realizează precipitarea proteinelor, altul nepolar pentru extragerea cantitativă a lipidelor.

Extractul lipidic este dozat specific fiecărei metode. S-au folosit diferite amestecuri de solvenți în condiții de temperatură variate.

Metodele colorimetrice sunt mai comode, rapide și suficient de exacte, fiind cele mai folosite în prezent.

#### *II.5.1.1. METODA WOODMAN PRICE*

**Principiul metodei:**

Lipidele plasmatice formează cu **fosfovanilina,** în prezența $H_2SO_4$ concentrat, un compus colorat în **roz-violaceu.** Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația lipidelor din proba respectivă.

Mecanismul reacției implică următoarele etape:

► hidroliza lipidelor plasmatice prin fierbere cu $H_2SO_4$ concentrat, formându-se acizi grași și alcoolii corespunzători:

Triacilgliceroli
Glicerofosfolipide → $R-(CH_2)_n-COOH$ +
Colesterol esterificat

$+ R-(CH_2)_n-CH=CH-COOH$ + Glicerol + Colesterol

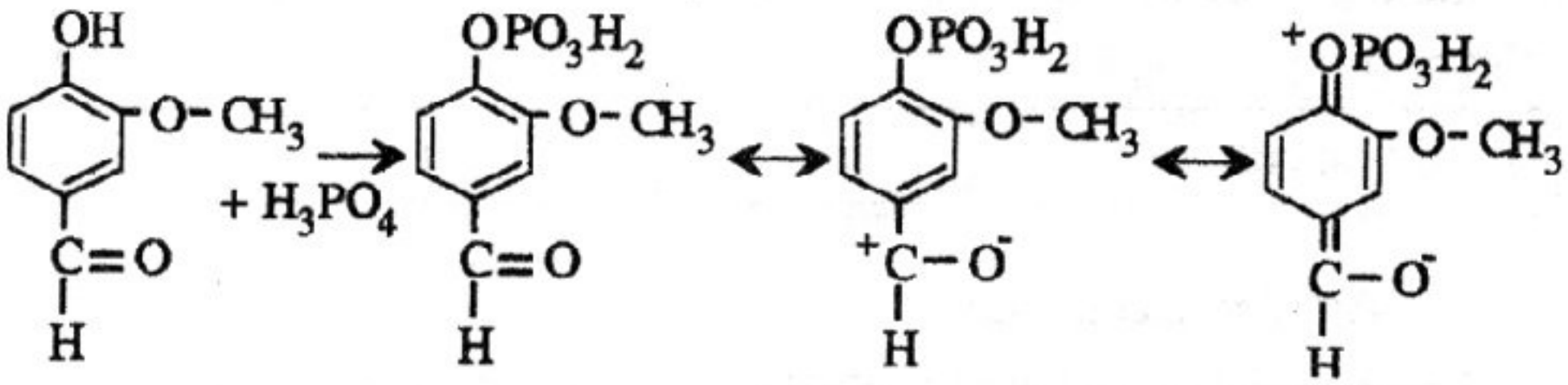
► transformarea acizilor grași în ioni de carboniu:

$$R-(CH_2)_n-CH_2-CH_2-COOH \xrightarrow{H_2SO_4} R-(CH_2)_n-CH=CH-COOH$$

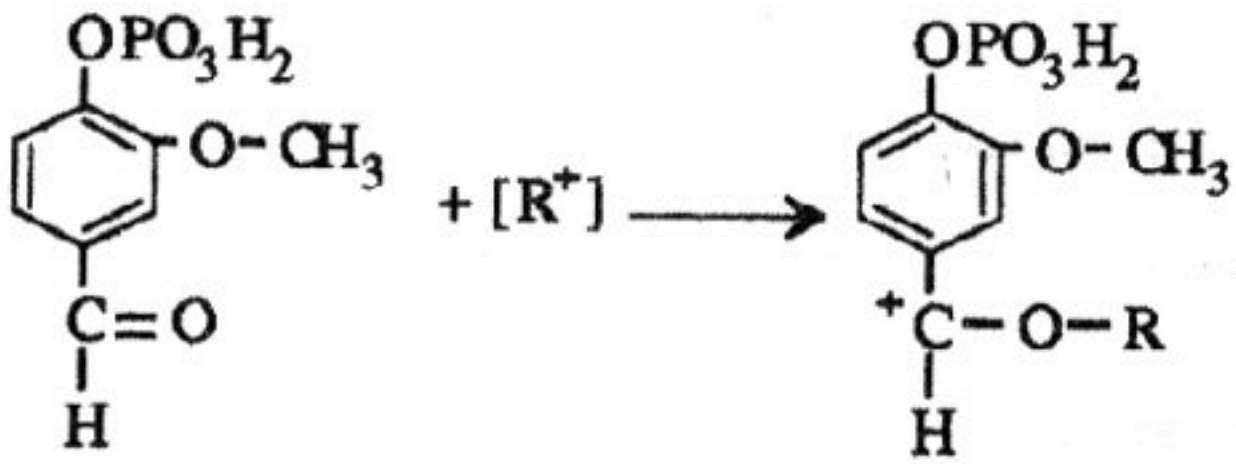
$$H_2SO_4 \rightleftharpoons H^+ + HSO_4^-$$

$$R-(CH_2)_n-CH=CH-COOH + H^+ \rightarrow R-(CH_2)_n-CH^+-CH_2-COOH$$

► vanilina este esterificată de $H_3PO_4$ sau $KH_2PO_4$:




► ionul de carboniu format reacționează cu fosfovanilina formând un compus de culoare roz-violaceu:




**Reactivi:**

1. Acid sulfuric concentrat
2. Reactiv de culoare (fosfoanilină)preparat astfel:

vanilină ..... 0,3 g

$KH_2PO_4$ ..... 6 g

Se dizolvă în apă distilată și se aduce la 100 ml.

3. Soluție standard de trioleină 500 mg/ 100 ml în cloroform sau 75 mg colesterol la 100 ml acid acetic glacial (corespunzând după diluție unei concentrații de lipide de 1000 mg/ 100ml.

**Tehnica de lucru**

Se pipetează în trei eprubete:

| **Reactivi** | **Probă (ml)** | **Standard (ml)** | **Martor (Blanc) (ml)** |
|---|---|---|---|
| Plasmă (ser) diluată 1:10 | 0,1 | - | - |
| Ser fiziologic | - | - | 0,1 |
| Standard diluat 1:10 | - | 0,1 | - |
| $H_2SO_4$ concentrat | 1 | 1 | 1 |
| Fierbere pe baie de apă timp de 20 minute<br>Răcire sub jet de apă | | | |
| Reactiv de culoare | 2 | 2 | 2 |

Agitare. Răcire sub jet de apă.

Se lasă 10 minute în repaus și apoi se citesc extincțiile la $\lambda$ = 530 mm.

**Calcul:**

$$\text{mg lipide/100 ml} = \frac{E_p - E_M}{E_S - E_M} \times 500$$

În locul probei standard se poate folosi a curbă de etalonare realizată cu soluții de trioleină de diferite concentrații. Valoarea extincției se integrează în curba respectivă.

**Observații:**

- eprubetele și pipetele folosite trebuie să fie bine degresate, spălate cu apă distilată și uscate;
- dacă reactivul fosfovanilinic are culoarea roz nu mai trebuie folosit fiind necesar reactiv preparat proaspăt;
- dacă extincțiile probei înregistrează valori foarte mari se lucrează cu ser diluat 1:20.

## II.6. COLESTEROLUL

Colesterolul este un component lipidic specific organismelor animale, prezent în toate celulele, precum și în lichidele biologice.

Colesterolul are atât proveniență **exogenă**, de origine animală, cât și **endogenă**.

Din cele 300-700 mg colesterol prezent în alimente se absoarbe la nivelul intestinului aproximativ 30-50%.

Cea mai mare parte din colesterolul tisular este endogen, sintetizat printr-un proces complex din acetil coenzima A.

În țesuturi și plasmă, colesterolul există atât sub formă liberă cât și esterificat.

Esterificarea este realizată în plasmă de o enzimă plasmatică funcțională, lecitin colesterol acil transferaza (LCAT).

Transportul colesterolului liber și esterificat între diferitele compartimente este realizat de două clase de lipoproteine majore:

- fracțiunea LDL transportă colesterolul de la ficat (locul majoritar al sintezei) la țesuturi;
- fracțiunea HDL transportă colesterolul de la țesuturi la ficat, pentru a fi metabolizat.

Principala cale de metabolizare a colesterolului se realizează în ficat prin transformarea sa în acizi biliari. O parte din colesterol se elimină ca atare în bilă și, în cazul modificării unor caracteristici ale acesteia, poate precipita formând calculi biliari (aproximativ 80%din calculii biliari sunt formați din colesterol).

Cantități reduse de colesterol sunt transformate în steroli care se elimină prin fecale, colestanol și coprostanol.

Deoarece concentrația colesterolului plasmatic din cele două fracțiuni lipoproteice este în strânsă legătură cu riscul pentru boli cardiovasculare și ateroscleroză, interpretarea rezultatelor obținute la determinarea acestuia se face ținând cont de următorii factori: vârstă, sex, alimentație, regim de viață.

Tabelul II.4. prezintă valorile normale pentru colesterolul plasmatic în funcție de vârstă.

Tabel II.4. **VALORILE NORMALE ALE COLESTEROLULUI PLASMATIC PENTRU ROMÂNIA**

| Decada de vârstă | mmol/l | mg/100 ml |
|---|---|---|
| nou născut | 1,8-2,3 | 70-90 |
| 1-19 ani | 3,5-4,44 | 135-170 |
| 20-29 ani | 3,7-4,7 | 145-180 |
| 30-39 ani | 3,9-4,9 | 150-190 |
| 40-49 ani | 4,5-5,7 | 175-220 |
| 50-59 ani | 4,9-6,1 | 190-235 |
| peste 60 ani | 5,2-6,5 | 200-250 |

$mmol/l = mg/100\ ml \cdot 2586 \cdot 10^{-5}$

$mg/100\ ml = mmol/l \cdot 3867 \cdot 10^{-2}$

Tabel II.5. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE COLESTEROLULUI**

| Hipercolesterolemie | Hipocolesterolemie |
|---|---|
| • ateroscleroză | • tulburări endocrine |
| • hipertensiune arterială | - hipertiroidism |
| • tulburări endocrine: | • afecțiuni hepatice |
| - diabet zaharat; | - ciroză; |
| - hipotiroidism; | - hepatite virale; |
| - sindrom Cushing. | - atrofia galbenă a ficatului. |
| • nefroză lipoidică | • infecții |
| • icter mecanic | - pneumonie; |
| | - tuberculoză. |
| | • diverse |
| | - anemie pernicioasă; |
| | - leucemie. |

Până la 35 de ani nu există diferențe între sexe. După această vârstă, concentrația colesterolului crește mai repede la bărbați până la 55 de ani. La femei creșterea este mai accentuată până la 60 de ani. Hipercolesterolemie fiziologică apare în perioada prementruală și în sarcină.

Variațiile patologice ale colesterolului din plasmă și țesuturi prezintă aspecte diferite:

- ◆ variații secundare ale bilanțului colesterolului însoțite de modificări ale colesterolemiei.
- ◆ tulburări idiopatice de depunere a colesterolului sub formă de xantoame sau ateroame în diferite organe: xantomatoză viscerală, xantomatoză osoasă, xantomatoză cutanată, xantomatoză generalizată, ateromatoză.

## *II.6.1. DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL*

Dozarea colesterolului total din plasmă se efectuează prin:

- metode colorimetrice;
- metode enzimatice.

Metodele colorimetrice se bazează pe măsurarea intensității culorii compușilor formați de colesterol cu diferiți reactivi: anhidridă acetică și acid sulfuric, clorură ferică și acid sulfuric.

Pentru a putea lucra în prezența proteinelor fără a le afecta, se adaugă fie acid sulfosalicilic, fie acid 2,5 dimetilbenzensulfonic.

Aceste metode sunt rapide, simple, dar nu sunt strict specifice.

Metodele enzimatic colorimetrice sunt mult mai exacte, deoarece conțin enzime care acționează numai asupra colesterolului transfomându-l pentru a putea reacționa cu anumiți reactivi. Sunt micrometode, dar nu se folosesc pe scară largă deoarece seturile de reactivi necesare sunt mai scumpe.

### *II.6.1.1. METODA RAPPAPORT*

**Principiul metodei**

Colesterolul plasmatic formează în prezența anhidridei acetice și a acidului sulfuric concentrat derivați sulfonici ai dicolestandienei de culoare verde-albastră (vezi reacția Liebermann-Burchard). Intensitatea culorii verzi apărute este proporțională cu concentrația colesterolului în proba analizată.

**Reactivi:**

1. Anhidridă acetică
2. Acid sulfuric concentrat
3. Acid sulfosalicilic 12% în acid acetic glacial
4. Standard de colesterol în acid acetic glacial care are o concentrație de 250 mg/ 100ml.

**Tehnica de lucru**

Se pipetează în eprubete conform schemei:

| Reactivi | Probă | Standard | Martor (Blanc) |
|---|---|---|---|
| Plasmă (ser) | 0,1 | - | - |
| Standard de colesterol | - | 0,1 | - |
| Apă distilată | - | - | 0,1 |
| Acid sulfsolicilic | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| Anhidridă acetică | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Se omogenizează conținutul fiecărei eprubete și se lasă să se răcească 10-20 minute în apă cu gheață | | | |
| $H_2SO_4$ concentrat | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

Se omogenizează cu grijă conținutul eprubetelor, apoi se lasă în repaus 10 minute la întuneric.

Se măsoară extincțiile probelor ($E_p$) și standardului ($E_s$) față de martor la $\lambda = 610$ nm (se obțin valori bune în intervalul 580-620 nm)

**Calcul:**

$$\text{mg colesterol/100 ml} = \frac{E_p - E_M}{E_S - E_M} \times 250$$

**Observații:**

► Există și o variantă a acestei metode în care acidul sulfosalicilic se adaugă într-o soluție de anhidridă și acid acetic obținându-se un reactiv unic.

### *II.6.1.2. MICROMETODA CU ACID 2,5 DIMETILBENZEN SULFONIC*

**Principiul metodei**

Colesterolul plasmatic formează în prezența anhidridei acetice și a acidului sulfuric concentrat derivați intens colorați în albastru care virează în verde. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația colesterolului în proba analizată. Acidul 2,5 dimetilbenzensulfonic permite determinarea fără deproteinizare.

**Reactivi**

1. Reactiv de culoare

Acid 2,5 dimetilbenzensulfonic ..... 5,6 g

Acid acetic glacial ..... 100 ml

Se dizolvă și apoi se adaugă:

Anhidridă acetică ..... 300ml

Acid acetic glacial ..... 100 ml

Reactivul este stabil 30 de zile la temperatura camerei, în flacon brun, închis ermetic.

2. Acid sulfuric concentrat

3. Standard de colesterol în acid acetic glacial cu concentrația 200 mg/100 ml soluție

**Tehnica de lucru**

Se pipetează în eprubete conform schemei:

| **Reactivi** | | **Probă** | **Standard** | **Martor (Blanc)** |
|---|---|---|---|---|
| Reactiv de culoare | ml | 1 | 1 | 1 |
| Plasmă | ml | 0,02 | - | - |
| Standard de colesterol | ml | - | 0,02 | - |
| Apă distilată | ml | - | - | 0,02 |
| Se omogenizează conținutul eprubetelor și se lasă 10 minute la temperatura camerei. | | | | |
| $H_2SO_4$ concentrat | ml | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

Se omogenizează cu grijă. Se lasă 10 - 20 minute la întuneric.

Se citesc extincțiile probelor și standardului față de martor la $\lambda$ = 560 nm

**Calcul:**

$$\text{mg colesterol/100 ml plasmă} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \times 200$$

Valorile normale pentru determinarea colesterolului prin metode colorimetrice sunt:

| | | |
|---|---|---|
| • până la 40 ani | 150-220 mg/100 ml | 3,9-5,7 mmol/l |
| • după 40 ani | 150-250 mg/100 ml | 3,9-6,5 mmol/l |

**Observații:**

- eprubetele și pipetele folosite trebuie să fie perfect curate și uscate.
- nu se fac determinări pe plasmă hemolizată.
- plasma icterică determină obținerea unor valori crescute cu 5-6 mg/100 ml

### *II.6.1.3. METODA ENZIMATICĂ*

**Principiul metodei**

$$\text{Colesterol esterificat} + H_2O \xrightarrow{\text{colesterolesterază}} \text{Colesterol} + \text{Acizi grași}$$

$$\text{Colesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{colesteroloxidază}} \Delta\text{-4-Colestenonă} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-Aminoantipirină} + \text{Fenolat de sodiu} \xrightarrow{\text{peroxidază}} \text{chinonimină (culoare roșie)} + 4H_2O$$

**Reactivi**

1. Reactivul stoc se găsește în trusă gata preparat și conține:

| | |
|---|---|
| 4 - Aminoantipirină | 0,5 mmol/l |
| Peroxidază | 2000 U/l |
| Fenolat de sodiu | 20 mmol/l |
| Colesteroloxidază | 150 U/l |
| Colesterolesterază | 200 U/l |
| Tampon fosfat (pH = 6,5) | 68 mmol/l |

În momentul folosirii se adaugă peste conținutul unui flacon cu reactiv stoc 50 ml apă bidistilată.

Reactivul de lucru obținut este stabil 2 săptămâni la temperatura camerei sau 1 lună la 2-8º C.

2. Standard de colesterol - 200 mg/100 ml

**Tehnica de lucru**

Se pipetează în eprubetele sau în cuvele în care se face citirea conform schemei:

| Reactivi | | Probă | Standard | Martor (Blanc) |
|---|---|---|---|---|
| Plasmă (ser) | ml | 0,02 | - | - |
| Standard de colesterol | ml | - | 0,02 | - |
| Reactiv de lucru | ml | 2 | 2 | 2 |

Se omogenizează bine și se incubează cel puțin 25 minute la 25ºC.

Se citesc extincțiile probei ($E_p$) și standardului ($E_s$) față de martor la $\lambda = 546$ nm.

**Calcul:**

$$\text{mg colesterol/100 ml} = \frac{E_P}{E_S} \text{x200}$$

**Observații:**

- dacă probele au concentrația colesterolului mai mare de 530 mg/100 ml (se obțin valori mari ale extincției) este necesară diluarea lor cu ser fiziologic și determinarea colesterolului în proba diluată.

Rezultatul se înmulțește cu diluția realizată

**Valori normale:** până la 200 mg/100 ml plasmă

### *II.6.1.4. DOZAREA COLESTEROLULUI LIBER ȘI ESTERIFICAT*

În plasmă, colesterolul se găsește atât liber cât și sub formă esterificată.

O treime din colesterolul total este liber și 2/3 este esterificat.

**Principiul metodei**

Colesterolul liber din plasmă se extrage cu alcool izopropilic și se precipită cu digitonină. Se dozează prin metoda bazată pe reacția Liebermann-Burchard.

Rezultatul obținut se scade din valoarea colesterolului total pentru a afla colesterolul esterificat.

**Reactivi**

1) Alcool izopropilic

2) Soluție de digitonină în alcool izopropilic:

digitonină ..... 250 mg

alcool izopropilic ..... 100 ml

3) Reactivul colesterolului ce conține:

acid acetic ..... 7 moli/l

anhidridă acetică ..... 6,5 moli/l

acid sulfosalicilic ..... 50 moli/l

Se amestecă 305 ml anhidridă acetică și 195 ml acid acetic glacial într-un balon menținut în apă cu gheață. În amestecul obținut se dizolvă 5,5 g acid sulfosalicilic. Amestecul se conservă 1 lună la temperatura camerei în flacon brun, închis ermetic.

4) Acid sulfuric concentrat

5) Standard de colesterol cu concentrația 250 mg/100 ml

6) Acid acetic glacial

7) Acetonă

**Tehnica de lucru**

Se pipetează în eprubete de centrifugă conform schemei:

| Reactivi | Probă | Blancul probei | Standard | Blancul reactivilor |
|---|---|---|---|---|
| Plasmă (ser) | 0,1 | 0,1 | - | - |
| Alcool izopropilic | - | 1 | - | - |
| Soluție digitonină | 1 | - | - | - |

Se omogenizează prin rotirea eprubetelor. Se lasă în repaus 10 minute, apoi se centrifughează. Se aruncă supernatantul.

Se introduc în eprubete 5 ml acetonă și se agită pentru a resuspenda reziduul.

Se centrifughează, se decantează supernatantul și se aduce la sec.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Reziduu sec | + | + | - | - |
| Reactivul colesterolului | 2,5 | 2,5 | - | - |
| Se agită precipitatul cu o baghetă și apoi se centrifughează | | | | |
| Supernatant | 1 | 1 | - | - |
| Reactivul colesterolului | - | - | 1 | 1 |
| Standard colesterol | - | - | 0,02 | - |
| Acid acetic | - | - | - | 0,02 |
| Se introduc eprubetele în baie de apă la temperatura camerei timp de 5 minute | | | | |
| Acid sulfuric | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

Se agită energic până ce precipitatul se dizolvă și se lasă 10-20 minute într-o baie de apă la temperatura camerei.

Se citesc extincțiile la $\lambda = 625$ nm.

**Calcul:**

$$\text{mg colesterol liber/100 ml} = \frac{E_P - E_{BP}}{E_S - E_{BR}} \times 200$$

Colesterol esterificat = colesterol total – colesterol liber

Raportul colesterol esterificat/colesterol total este 0,65-0,75

Acest raport permite diferențierea și prognosticul icterelor, fiind:

- normal în icterul mecanic;
- ușor scăzut în hepatite virale;
- scăzut în icter grav parenchimatos.

### *II.6.1.5. DOZAREA HDL-COLESTEROLULUI*

Simpla determinare a colesterolului total nu are o importanță diagnostică exactă în a aprecia riscul pentru bolile cardiovasculare și ateroscleroză, deoarece în plasmă colesterolul este transportat de două fracțiuni lipoproteice cu rol diferit în metabolizarea acestuia.

Din acest motiv s-au pus la punct metode care să completeze dozarea colesterolului total, liber și esterificat, prin determinarea colesterolului transportat de HDL și LDL.

**Principiul metodei**

Chilomicronii, LDL și VLDL sunt precipitate cu acid fosfowolframic în prezența ionilor de magneziu. În supernatantul obținut după centrifugare și care conține numai fracțiunea HDL se dozează colesterolul prin metoda enzimatică.

**Reactivi:**

1) Reactiv de precipitare pregătit din patru părți reactiv 2 și o parte reactiv 3 (pH = 6,2). Este stabil 6 săptămâni la 20-25°C.

2) Soluție de acid fosfowolframic:

acid fosfowolframic ..... 32 g

apă distilată ..... ad. 100 ml

3) Soluție de clorură de magneziu 0,4 mmol/l

4) Standard de colesterol 50 mg/100 ml soluție

5) Trusa pentru dozarea colesterolului prin metoda enzimatică

**Tehnica de lucru**

**Separarea HDL**

În eprubete se pipetează 0,5 ml ser și 0,05 ml reactiv de precipitare. Se amestecă. Se lasă 10 minute la temperatura camerei, apoi se centrifughează 15 minute la 5000 rot/min.

**Dozarea colesterolului din HDL**

Se pipetează în eprubete conform schemei:

| Reactivi | Martor | Standard | Probă |
|---|---|---|---|
| Amestec de reactiv de dozare a colesterolului | 1 | 1 | 1 |
| Apă distilată | 0,05 | - | - |
| Standard de colesterol | - | 0,05 | - |
| Supernatant | - | - | 0,05 |

Se lasă 5 minute la 37°C. Se citesc extincțiile ($E_P$, $E_S$ și $E_M$) la $\lambda = 500$ nm.

**Calcul:**

$$\text{mg colesterol HDL/100 ml} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \times 50$$

**Valorile normale:** bărbați: 35-55 mg/100 ml

femei: 45-65 mg/100 ml

**HDL-colesterolul** este fracțiunea antiaterogenă a colesterolului, valoarea crescută a acesteia prezentând risc scăzut pentru dezvoltarea bolilor cardiovasculare.

### *II.6.1.6. DOZAREA LDL-COLESTEROLULUI*

**Principiu metodei**

LDL precipită cu heparină la punctul izoelectric (pH = 5,04). După centrifugare, HDL și VLDL rămân în supernatant. În aceste fracțiuni se dozează colesterolul prin metoda descrisă anterior.

**Reactivi:**

1) Reactiv de precipitare: heparină

2) Reactiv de culoare ca la tehnica anterioară

**Tehnica de lucru**

Se pipetează:

| Reactivi | Probă |
|---|---|
| Plasmă | 100 µl |
| Reactiv de precipitare | 1000 µl |

Se agită, se lasă să stea 10 minute la 15-25ºC, se centrifughează 15 minute la aproximativ 4000 rot/min.

În decurs de o oră de la centrifugare trebuie dozat colesterolul conform schemei de la dozarea HDL-colesterolului.

**Calcul:**

Dacă se folosește standard de colesterol, rezultatul se calculează din:

$$\text{colesterol/100 ml} = \frac{E_P}{E_S} \text{ x concentrația standard}$$

Calcul LDL-colesterol

LDL-colesterol = colesterol total - colesterol supernatant

**Valori de referință.** LDL-colesterol este fracțiunea cu risc pentru boli cardiovasculare

LDL-colesterol < 150 mg/100 ml - risc scăzut

LDL-colesterol = 150-190 mg/100 ml - posibil risc pentru boli cardiovasculare

LDL-colesterol > 190 mg/100 ml - risc crescut

## II.7. TRIACILGLICEROLII

Triacilglicerolii sunt principalele componente lipidice ale raţiei alimentare. Digestia lor are loc la nivelul intestinului, în prezența sărurilor biliare, sub acțiunea lipazei care-i transformă în glicerol și acizi grași. După absorbție, triacilglicerolii se resintetizează în intestin și sunt înglobați în chilomicroni care-i transportă prin limfă în torentul circulator.

Triacilglicerolii au și origine endogenă, fiind sintetizați în ficat și țesutul adipos, transportul acestora prin sânge realizându-se, mai ales, sub forma lipoproteinelor VLDL.

Tabelul II.6. **VALORILE MEDII ALE CONCENTRAȚIEI TRIACILGLICEROLILOR PLASMATICI**

| Vârsta | Trigliceridemia (mg/100 ml) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Bărbați | | Femei | |
| | a | b | a | b |
| 5-15 | 110 | 60 | 120 | 65 |
| 15-30 | 150 | 75 | 160 | 80 |
| 30-45 | 200 | 115 | 210 | 120 |
| 45-65 | 230 | 135 | 240 | 140 |
| > 70 | 225 | 135 | 270 | 140 |

a) după N. Tietz, 1986 (valorile pentru SUA)

b) după I. Mincu, 1976 (valorile pentru România)

Trigliceridemia (concentrația triacilglicerolilor în plasmă) este un parametru biochimic cu o mare valoare diagnostică în aprecierea bilanțului lipidic.

Tabelul II.7. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE TRIGLICERIDEMIEI**

| Hipertrigliceridemie | Hipotrigliceridemie |
|---|---|
| ◆ ateroscleroză<br>◆ afecțiuni endocrine<br>- diabet zaharat<br>- hipotiroidism<br>◆ hiperlipemie esențială<br>◆ sindrom nefrotic | ◆ afecțiuni endocrine<br>- hipertiroidism<br>◆ infecții<br>◆ analfalipoproteinemie<br>◆ abetalipoproteinemie |

Concentrația triacilglicerolilor în sânge variază în funcție de vârstă, sex și zona geografică, așa cum reiese din tabelul II.6.

Variațiile patologice ale concentrației triacilglicerolilor în plasmă sunt prezentate în tabelul II.7.

### *II.7.1. METODE DE DOZARE A TRIACILGLICEROLILOR*

Pentru dozarea triacilglicerolilor în ser sau plasmă se pot folosi:

- metode colorimetrice;
- metode enzimatice.

Metodele colorimetrice sunt mai laborioase deoarece presupun parcurgerea mai multor etape până la reacția de culoare propriu-zisă:

- extracția lipidelor;
- îndepărtarea fosfolipidelor și colesterolului;
- hidroliza triacilglicerolilor;
- oxidarea glicerolului la formaldehidă;
- dozarea formaldehidei cu acetil acetonă, acid cromotropic sau fenilhidrazină.

În prezent, pentru dozarea triacilglicerolilor se folosesc metodele enzimatice, deoarece acestea sunt mai rapide și mult mai exacte folosind enzime care acționează numai asupra triacilglicerolilor și glicerolului rezultat prin hidroliza acestora.

### *II.7.1.1. METODA TIXIER-CLAUDE*

**Principiul metodei**

Triacilglicerolii din ser sau plasmă se saponifică eliberându-se glicerol și acizi grași. Glicerolul se oxidează la formaldehidă care se dozează prin reacția de condensare cu fenilhidrazină.

Glicerolul liber, preexistent în proba respectivă, se dozează prin aceleași etape, fără saponificare. Proteinele, săpunurile, fosfolipidele, pigmenții se elimină prin absorbția pe hidroxid de magneziu.

**Reactivi:**

1) Metaperiodat de sodiu 2,5%. Se păstrează la rece.

2) Clorhidrat de fenilhidrazină soluție 4% care se prepară extemporaneu.

3) Sulfat de magneziu preparat din 3,7 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ în 100 ml apă distilată.

4) Soluție alcoolică de hidroxid de potasiu 4% care se conservă la rece maxim 3 săptămâni.

5) Acid sulfuric 2N.

6) Acid clorhidric 5N.

7) Soluție standard de trioleină pregătită prin dizolvarea a 100 mg trioleină p.a. (aproximativ 0,12 ml) într-un balon cotat de 100 ml și aducerea la semn cu cloroform. Se păstrează la frigider.

**Tehnica de lucru**

**a) Saponificarea**

Se pipetează în eprubete de centrifugă conform schemei:

| Reactivi | Glicerol total (T) | Glicerol liber (L) | Standard | Martor (Blanc) |
|---|---|---|---|---|
| Plasmă (ser) | 0,1 | - | - | - |
| Standard de trioleină | - | - | 0,1 | - |
| Hidroxid de potasiu | 0,5 | - | 0,5 | 0,5 |
| Se omogenizează și se ține 1 oră la 37ºC sau 30 minute la 60ºC | | | | |
| Plasmă (ser) | - | 0,1 | - | - |
| Sulfat de magneziu | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Apă distilată | 3 | 3 | 3 | 3,1 |
| Hidroxid de potasiu | - | 0,5 | - | - |

Se omogenizează. Se centrifughează 3 minute la 3000 rot/min

b) **Oxidarea**

| | Glicerol total (T) | Glicerol liber (L) | Standard | Martor (Blanc) |
|---|---|---|---|---|
| Supernatant | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Acid sulfuric 2N | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Metaperiodat de sodiu | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

Se omogenizează. Se lasă 10 minute la întuneric.

c) **Reacția de culoare**

| | Glicerol total (T) | Glicerol liber (L) | Standard | Martor (Blanc) |
|---|---|---|---|---|
| Fenilhidrazină HCl | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Se omogenizează. Se lasă 10 minute la întuneric | | | | |
| Acid clorhidric 5N | 2 | 2 | 2 | 2 |

Se omogenizează. Se lasă 15-30 minute la întuneric și apoi se măsoară extincțiile la $\lambda = 520$ nm.

**Calcul:**

$$\text{mg trigliceride/100 ml} = \frac{E_T - E_L}{E_S} \text{ x concentrația standardului}$$

concentrația standard = 100 mg/100 ml

**Valori normale:** la bărbați până la 150 mg triacilgliceroli/100 ml ser (plasmă); la femei până la 130 mg triacilgliceroli/100 ml ser (plasmă).

**Observații:**

► extincția martorului nu trebuie să depășească 0,1. Dacă valoarea este mai mare, alcoolul etilic în care se pregătește hidroxidul de potasiu trebuie redistilat;

► hemoliza ușoară sau icterul nu împiedică determinarea;

► nu trebuie folosit citratul de sodiu ca anticoagulant pentru recoltarea plasmei;

► dacă serul sau plasma au fost păstrate la frigider trebuie omogenizate înainte de analiză.

Aceleași etape sunt parcurse la determinarea trigliceridelor prin metoda Gotfried-Rosenberg, numai că dozarea formaldehidei se face cu acetil acetonă și acetat de amoniu conform reacției Hantzch.

### *II.7.1.2. METODA ENZIMATICĂ*

**Principiul metodei**

$$\text{Triacilgliceroli} + H_2O \xrightarrow{\text{lipază}} \text{Glicerol} + \text{Acizi grași}$$

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{glicerol kinază}} \text{Glicerol-3-}\textcircled{P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicerol-3-}\textcircled{P} + O_2 \xrightleftharpoons{\text{glicerol-3-}\textcircled{P}\text{ oxidază}} \text{dihidroxi aceton fosfat} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{2-clorfenol} + \text{4-aminoantipirină} \xrightarrow{\text{peroxidază}} \text{Chinonimină} + 4H_2O + HCl$$

**Reactivi**

1) Soluție tampon fenol-clorat de sodiu (pH = 7,5) 0,1 mol/l

2) Reactiv stoc ce conține:

Acetat de magneziu ..... 12,8 mmol/l

4-aminoantipirină ..... 1 mmol/l

ATP ..... 2 mmol/l

2-clorfenol ..... 2 mmol/l

Peroxidază ..... 1 U/ml

Glicerol kinază ..... 0,2 U/ml

Glicerol-3- Ⓟ oxidază ..... 1,5 U/ml

Lipază ..... 10 U/ml

Polietilenglicolmonoetileter ..... 2 g/l

Reactivul de lucru se obține prin dizolvarea conținutului flaconului de reactiv stoc în 11 ml soluție tampon. Soluția este stabilă 2 săptămâni la frigider sau 2 zile la temperatura camerei.

3) Standard de trigliceride ce conțin 2,29 mmol/l glicerol pentru o concentrație de 200 mg trigliceride/100 ml.

**Tehnica de lucru**

Se pipetează în eprubete sau cuve conform schemei:

| Reactivi | Probă | Standard |
|---|---|---|
| Plasmă (ser) | 0,01 | - |
| Standard de trigliceride | - | 0,01 |
| Reactiv de lucru | 1 | 1 |

Se omogenizează. Se lasă în repaus 10 minute la 20-25°C. Se măsoară extincțiile la $\lambda$ = 546 nm. Culoarea este stabilă 1 h de la sfârșitul reacției.

**Calcul:**

$$\text{mg trigliceride/100 ml plasmă (ser)} = \frac{E_P}{E_S} \text{x200}$$

**Valoarea normală:** până la 150 mg/100 ml plasmă (ser).

**Observații:**

◆ în cazul în care concentrația triacilglicerolilor este mai mare de 1000 mg/100 ml se diluează 1 parte din proba de analizat cu 5 părți ser fiziologic. La calcularea rezultatului se ține cont de diluție;

◆ se scade din rezultatul obținut valoarea de 10 mg/100 ml corespunzătoare glicerolului liber.

## II.8. FOSFOLIPIDELE

Fosfolipidele plasmatice provin din sinteza endogenă. În plasmă, diferitele fosfolipide se găsesc în următoarele procente:

a) lecitine 66%;

b) sfingomieline 22%;

c) lizolecitine 9%;

d) cefaline 3%.

Valorile normale ale fosfolipidelor plasmatice variază în funcție de vârstă și sunt prezentate în tabelul II.8.

Așa cum se observă, valorile sunt mai mici la naștere, crescând odată cu vârsta la ambele sexe.

La femei, valoarea fosfolipidelor este mai mare în perioada sarcinii.

Tabelul II.8. **VALORILE NORMALE ALE FOSFOLIPIDELOR PLASMATICE**

| Vârsta | mmol/l | mg/100 ml |
|---|---|---|
| nou născut | 0,5-1 | 40-80 |
| copii | 1-2,3 | 80-180 |
| adulți | 2,33-3,36 | 180-260 |

$mmol/l = mg/100\ ml \cdot 1292 \cdot 10^{-5}$

$mg/100\ ml = mmol/l \cdot 77,4$

Variațiile patologice ale fosfolipidelor sunt de cele mai multe ori paralele cu cele ale colesterolului, nefiind dozate în mod obișnuit în laborator.

Se întâlnesc valori crescute în:

- ciroză biliară; - diabet zaharat; - hiperlipemie esențială;
- sindrom nefrotic; - obstrucție biliară.

### *II.8.1. DOZAREA FOSFOLIPIDELOR (METODA GOMORI)*

**Principiul metodei**

Fosfolipidele sunt izolate prin precipitare cu acid tricloracetic, alături de proteine. Precipitatul se mineralizează cu acid sulfuric și acid percloric. Se dozează fosfatul rezultat din mineralizare prin reacția cu molibdat de amoniu, în mediu reducător. Intensitatea culorii albastre apărute este proporțională cu concentrația fosfatului în proba respectivă și, indirect, cu concentrația fosfolipidelor.

**Reactivi:**

1) Acid tricloracetic soluție 5% și 10%

2) Amestec nitro-percloric. Se amestecă 1 volum $HNO_3$ ($\rho$ = 1,42 g/cm$^3$) cu 2 volume acid percloric 65-70%.

3) Molibdat de amoniu preparat astfel:

molibdat de amoniu ..... 50 g

$(NH_4)_2MoO_4 \cdot 7H_2O$

$H_2SO_4$ 10N ..... 500 ml

Se dizolvă molibdatul în $H_2SO_4$ 10N și reactivul obținut se va dilua de fiecare dată pentru a fi proaspăt preparat (vezi 4).

4) Reactiv molibdenic de lucru. Se diluează 5 ml soluție molibdat de amoniu cu 35 ml apă distilată, se adaugă 2,5 g sulfat feros ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) și se aduce, după dizolvare, la 50 ml cu apă distilată.

5) Soluție standard de fosfat stoc: 1 mg fosfat/ml

fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ..... 11,55 g

apă distilată ..... ad. la 1000 ml

6) Soluție standard de lucru: 1 mg fosfați/100 ml soluție obținută prin diluarea soluției stoc.

**Tehnica de lucru**

**I. Izolarea fosfolipidelor prin precipitare**

Într-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

plasmă ..... 0,2 ml

apă distilată ..... 10 ml

acid tricloracetic 5% ..... 7 ml (adăugat picătură cu picătură)

Se lasă în repaus 2 minute și apoi se centrifughează 10 minute la 3500 rot/min. Se îndepărtează supernatantul cu grijă. Picăturile de lichid rămase se absorb pe hârtie de filtru.

**II. Mineralizare**

Se adaugă peste precipitatul din eprubetă 0,7 ml amestec nitropercloric (reactiv de mineralizare). Se încălzește eprubeta pe o baie de nisip electrică (sau la flacără foarte mică). Precipitatul se dizolvă, lichidul devine brun și se degajă vapori nitroși. Se continuă încălzirea până la decolorarea completă și limpezirea soluției. Mineralizarea durează între 20-60 minute (trebuie să nu se ajungă la uscarea completă, ci să mai rămână aproximativ 0,2 ml soluție).

**III. Dozarea**

În eprubete se pipetează:

| Reactivi | Probă | Standard | Martor |
|---|---|---|---|
| Reziduu de mineralizare | 0,2 | - | - |
| Standard de lucru | - | 2 | - |
| Acid tricloracetic 10% | 4 | 2,2 | 4,2 |
| Reactiv molibdenic | 2,8 | 2,8 | 2,8 |

Se amestecă și după 20 minute se măsoară extincțiile probelor și standardului față de martor la $\lambda = 750$ nm, în cuvă de 1 cm.

**Calcul:**

$$\text{mg P lipidic/100 ml ser} = \frac{E_P}{E_S} \times \frac{2}{0,2} = \frac{E_P}{E_S} \times 10$$

mg fosfolipide/100 ml ser = mg P lipidic x 25

## II.9. ACIZII GRAȘI LIBERI

Acizii grași liberi din sânge provin din hidroliza triacilglicerolilor sau din sinteza de "novo".

Transportul acestora prin sânge se realizează prin legarea lor de albumina plasmatică.

Acizii grași liberi din plasmă provin, în special, din țesutul adipos, dar reflectă și gradul de catabolizare a triacilglicerolilor tisulari, mai ales hepatici.

Scăderea concentrației glucozei sanguine sau a insulinemiei determină intensificarea lipolizei și creșterea concentrației acizilor grași din plasmă. Existența unui nivel crescut al acizilor grași liberi intensifică cetogeneza ducând la hipercetonemie și cetonurie, accelerează sinteza hepatică de trigliceride și crește concentrația VLDL.

Valoarea normală a acizilor grași liberi este de 9,5-16 mg/100 ml plasmă.

Variații fiziologice reprezentate de creșterea concentrației acizilor grași liberi apar la copii înainte de pubertate, la femei în ultimul trimestru al sarcinii. De asemenea, consumul exagerat de alcool, fumatul, frigul, stress-ul determină creșterea concentrației plasmatice a acizilor grași liberi.

Valori crescute ale concentrației acizilor grași liberi apar în diabetul zaharat, hipertiroidism, glicogenoze, feocromocitom.

### *II.9.1. DOZAREA ACIZILOR GRAȘI LIBERI*

**Principiul metodei**

Acizii grași extrași cu un amestec de izopropanol, heptan, $H_2SO_4$ formează cu ionii de cobalt un complex care se dozează prin reacția de culoare cu α-nitrozo-β-naftol.

**Reactivi:**

1) Amestec de extracție. Se amestecă 40 ml alcool izopropilic cu 10 ml n-heptan și se adaugă 1 ml acid sulfuric cu d = 1,84.

2) Soluția A. Se dizolvă 6 g azotat de cobalt ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) în 100 ml soluție saturată de sulfat de potasiu (25 g/100 ml apă adus la fierbere și păstrat la 37ºC cu cristale în exces pe fund). Se filtrează înainte de întrebuințare.

3) Soluția B. Soluție saturată de sulfat de sodiu obținută din dizolvarea a 50 g în 100 ml apă.

4) Reactiv de complexare. 1, 53 ml trietanolamină se aduc la 10 ml cu soluția A. Se adaugă 7 ml soluție B și se amestecă bine. Reactivul preparat nu este stabil și trebuie preparat extemporaneu la fiecare serie de determinări.

5) Cloroform-heptan. Se amestecă 5 volume cloroform cu un volum de n-heptan.

6) Reactiv de culoare. Se dizolvă 0,4 g α-nitrozo-β-naftol în 100 ml alcool etilic 96º.

7) Reactiv de culoare de lucru. Se diluează un volum soluție 6 cu 11,5 volume alcool etilic 96º.

**Curba de etalonare**

12,8 mg acid palmitic se dizolvă în 25 ml n-heptan, obținându-se o soluție cu concentrația 2 mEq/l. Aceasta se diluează cu 3 volume hexan realizându-se concentrația de 0,5 mEq/l. În trei eprubete cu dop rodat se pipetează: 0,1, 0,2 și 0,4 ml din această soluție și se evaporă la sec. Se adaugă în fiecare câte 0,2 ml NaCl 0,9%. S-au realizat probe de acid palmitic cu concentrațiile 0,25 mEq/l; 0,5 mEq/l; 1 mEq/l. Se prelucrează conform tehnicii de mai jos. Se va trasa curba de etalonare pentru valorile obținute.

**Tehnica de lucru**

Se pipetează în eprubete cu dop rodat probe de câte 0,2 ml ser, se adaugă 1,2 ml heptan și 2 ml apă distilată. Se agită trei minute. După separarea completă a fazelor, se iau 1,2 ml din faza superioară (heptanică) în altă eprubetă cu dop rodat, se adaugă 1,8 ml reactiv 5 și 2 ml reactiv 4 proaspăt. Se agită 5 minute, apoi se centrifughează pentru a separa bine fazele (15 minute la 2500 rot/min). Se pipetează în alte eprubete 1 ml din faza superioară și se adaugă 1,5 ml reactiv de culoare de lucru. Se amestecă. La fiecare serie se face un blanc cu 0,2 ml apă în

loc de ser, prelucrat la fel cu probele. Se măsoară extincțiile probelor față de martor la $\lambda = 500$ nm, în cuvă de 1 cm.

**Calcularea rezultatelor.**

Se integrează valorile obținute în curba de etalonare.

## II.10. CORPII CETONICI

Corpii cetonici (acid acetoacetic, acid β-hidroxi-butiric și acetonă) se formează în cantitate redusă din acetonele acetoacetil CoA rezultată în urma β-oxidării acizilor grași, la nivelul sistemelor enzimatice intramitocondriale hepatice. Acidul acetoacetic nu mai poate fi retransformat în acetoacetil-CoA și trece în circulație.

Țesuturile periferice extrahepatice pot prelua corpii cetonici din sânge grație unei enzime care transferă radicalul CoA de pe succinilCoA pe molecula acidului acetoacetic. Din această cauză, în caz de inaniție prelungită, corpii cetonici constituie o sursă de energie pentru țesuturile extrahepatice.

Nivelul normal al corpilor cetonici în sânge nu depășește 1 mg/100 ml, iar în urină 1 mg/24 h. Creșterea nivelului corpilor cetonici în sânge și urină reprezintă **cetonemia** și **cetonuria**, iar starea patologică la care se ajunge poartă denumirea de **acidocetoză**.

Urina în care se elimină corpi cetonici are miros caracteristic de acetonă sau de fructe.

Creșterea nivelului corpilor cetonici poate fi observată în următoarele situații:

- inaniție - începând cu ziua a doua sau a treia, la obezi;
- dieta excesiv de bogată în grăsimi;
- diabet zaharat sever cu deficit de insulină;
- maladia von Gierke când glucoza nu poate fi mobilizată din rezervele de glicogen;
- hipertiroidism, acromegalie, sindrom Cushing.

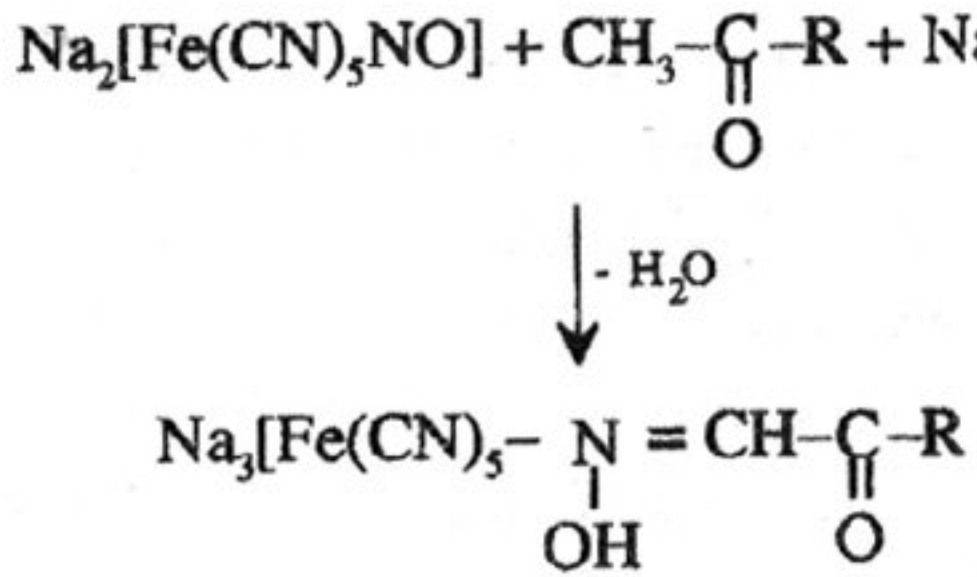
Toate aceste situații se caracterizează printr-o utilizare redusă a glucozei (lipsă de aport, de mobilizare sau de metabolizare) și un catabolism exagerat al acizilor grași.

În toate aceste stări este importantă identificarea și chiar dozarea corpilor cetonici în urină

**Reacția Imbert Legal**

Din punct de vedere clinic este important să se identifice prezența acetonei și a acidului acetil acetic; raportul normal acetonă/acid acetil acetic = 1:10.

Acidul acetil acetic și acetona formează cu nitroprusiatul de sodiu, în mediu alcalin, un complex colorat violet conform ecuației:




Pentru identificarea corpilor cetonici se pot folosi diferite teste rapide care se bazează pe modificarea culorii bandeletelor impregnate cu reactivi specifici și compararea culorii apărute cu o scală semicantitativă.

Aceste teste se comercializează sub diferite denumiri: Clinistix, Ketostix, Comburtest și sunt utile pentru realizarea unui examen sumar de urină rapid.

# III. EXPLORAREA METABOLISMULUI PROTEIC

## III.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Concentrația aminoacizilor liberi - componentele structurale ale proteinelor - din ser/plasmă sau din țesuturi reprezintă un indice biochimic important definind rezultanta mai multor direcții metabolice conform figurii III.1. Se poate constata că există un raport direct între procesele de digestie și absorbție anabolice și evident cele catabolice, în care sunt interesați toți aminoacizii din organism.

Această reflectare a interacțiunilor metabolice ale aminoacizilor poate fi analizată în laboratoarele clinice prin:

- identificarea sau chiar dozarea, mai ales în ser, unor aminoacizi individuali al căror metabolism poate fi viciat prin sinteza defectuoasă a unei/unor enzime implicate în metabolismul lor;
- determinarea aminoacidemiei și aminoaciduriei;
- analiza proteinelor serice sau tisulare;
- dozarea principalilor cataboliți ca: ureea, creatinina, acidul uric, bilirubina etc.

În plasma sanguină au fost identificați toți cei 22 de aminoacizi care intră în constituția proteinelor și, în afara acestora, aminoacizi ca ornitina, citrulina, acidul γ-aminobutiric, care, deși nu participă în structura proteinelor, au roluri metabolice importante.

**Aminoacidemia** - concentrația aminoacizilor din ser - prezintă variații calitative și cantitative ce depind de diverse stări fiziologice: natura alimentației, vârstă, sex, efort fizic.

Aminoacidemia prezintă și modificări diurne ce pot reprezenta variații de până la 30%, cele mai ridicate valori fiind în jurul orei $17^{00}$, iar cele mai scăzute în jurul orei $6^{00}$ dimineața. Aminoacizii traversează glomerulul renal dar sunt reabsorbiți în mare parte la nivelul tubului proximal.

Prin urmare, aminoaciduria este dependentă de valoarea aminoacidemiei, deoarece în mod normal nu întâlnim decât o proporție limitată de anumiți aminoacizi în urină.

Valorile normale ale aminoacizilor din sânge și urină sunt prezentate în tabelul III.1. (după Radu Mihai Vasile, 1986).

Tabelul III.1. **VALORILE AMINOACIZILOR LIBERI TOTALI**

| **Fluid biologic** | **Vârstă, sex** | **mmol/l** | | **mg/dl** |
|---|---|---|---|---|
| | | **media** | **limite** | |
| Plasmă | băieți 6-18 ani | 3,06 ± 0,30 | 2,46-3,66 | 35-40 |
| | fete 6-18 ani | 3,01 ± 0,36 | 2,29-3,73 | |
| | bărbați | 3,43 ± 0,31 | 2,81-4,05 | |
| | femei | 3,08 ± 0,38 | 2,32-3,84 | |
| | | mg/24 h | valoare medie | |
| urină | adulți | 450-680 | 550 ± 130 | |

În ceea ce privește situațiile patologice, în prezent, prin utilizarea unor tehnici adecvate a fost posibil să se precizeze mai mult de 60 de metabolisme viciate ale aminoacizilor, manifestate mai ales la copii și care pot să dea naștere la cazuri clinice deosebit de grave.

Multe din aceste boli genetice ale metabolismului proteic și care se manifestă fie printr-o **hiperaminoacidemie** sau **hiperaminoacidurie**, fie prin creșterea individuală a nivelului unor aminoacizi, pot să determine tulburări neurologice, întârzieri mintale sau chiar o moarte prematură.

Odată depistată veriga metabolică defectuoasă este posibil să se prevină consecințele acestei defecțiuni prin recomandarea unei diete specifice din care lipsește sau este crescut un anumit aminoacid.

În tabelul III.2. sunt prezentate principalele cauze ale aminoaciduriei și aminoacidemiei datorită unor defecte genetice.

Toate aceste afecțiuni cu caracter moștenit, genetice, au răsunet numai la copii până la 10 ani.

Tabelul III.2. **PRINCIPALELE AFECŢIUNI GENETICE DIN METABOLISMUL VICIAT AL AMINOACIZILOR**

| Tulburarea | Raport de cazuri/naşteri | Aminoacidul în exces în ser | Aminoacidul în exces în urină | Manifestare clinică | Cauza | Tratament |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Fenilcetonuria | 1/10000 | Phe | Fenilalanină şi derivaţi | Întârziere mintală | Absenţa fenilalanin hidroxilazei | Dietă fără Phe |
| Tirozinoza | 1/100000 | Tyr, Met | Tirozina şi metaboliţi | Ciroză hepatică/ Tulburări renale | | Dietă fără Phe, Tyr, Met |
| Alcaptonuria | 1/1000000 | Acid homogentisic | Acid homogentisic | -artrite degenerative<br>-pigmentarea cartilagiilor | Absenţa homogentisic oxidazei | – |
| Homocistinuria | 1/200000 | Homocisteina Met | Homocisteina /metionina | -oculare<br>-scheletice<br>-vasculare | Absenţa cistation sintetazei | Vitamina $B_6$/Cisteină/ Vitamina $B_{12}$ |
| Cetoaciduria (boala cu miros de arţar) | 1/250000 | Leu<br>Ile<br>Val | Leu<br>Ile<br>Val | -acidoză<br>-vomă<br>-întârzieri mintale<br>-tulburări respiratorii | Deficienţa cetoacid decarboxilaza de deramificare | Dietă fără Leu, Ile, Val |
| Histidinemia | 1/20000 | His/Ala | Imidazol/acid piruvic | -simptome neurologice<br>-defecte de vorbire | Absenţa histidinazei | Dietă fără histidină |
| Hiperglicidemia | 1/150000 | Gly | Glicocol | -epilepsie<br>-hipotonie<br>-întârziere mintală | Sistemul enzimatic de scindare a glicocolului | |

| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Acidemia metilmalonică | 1/20000 | Gly, acid metil malonic, cetonurie | Glicocol, acid metil malonic, cetonurie | -cetoacidoză<br>-întârziere mintală | Absența metil malonil CoA-mutazei | Vitamina $B_{12}$ |
| Cistationiuria | 1/70000 | Cistationina | Cistationina | -anomalie benignă | Absența cistationazei | Vitamina $B_6$ |
| Hiperprolinemia tip I | 1/300000 | Pro | Prolină/ glicocol | -debilitate mintală<br>-nefropatii cronice | Prolinoxidaza | |
| Hiperprolinemia tip II | – | Pro | Prolină | manifestări convulsive sindrom nefrotic | Dehidrogenaza acidului δ pirolin-5-carboxilic | Pro |
| Cistinuria | 1/13000 | – | Lisină/ arginină/ cistină | -calculi renali | Calculi renali | Alcalinizarea urinei/ multe lichide |
| Boala lui Hartinnup | 1/18000 | – | Toți aminoacizii neutri | -dermatite<br>-simptome psihiatrice | | Nicotin amida |

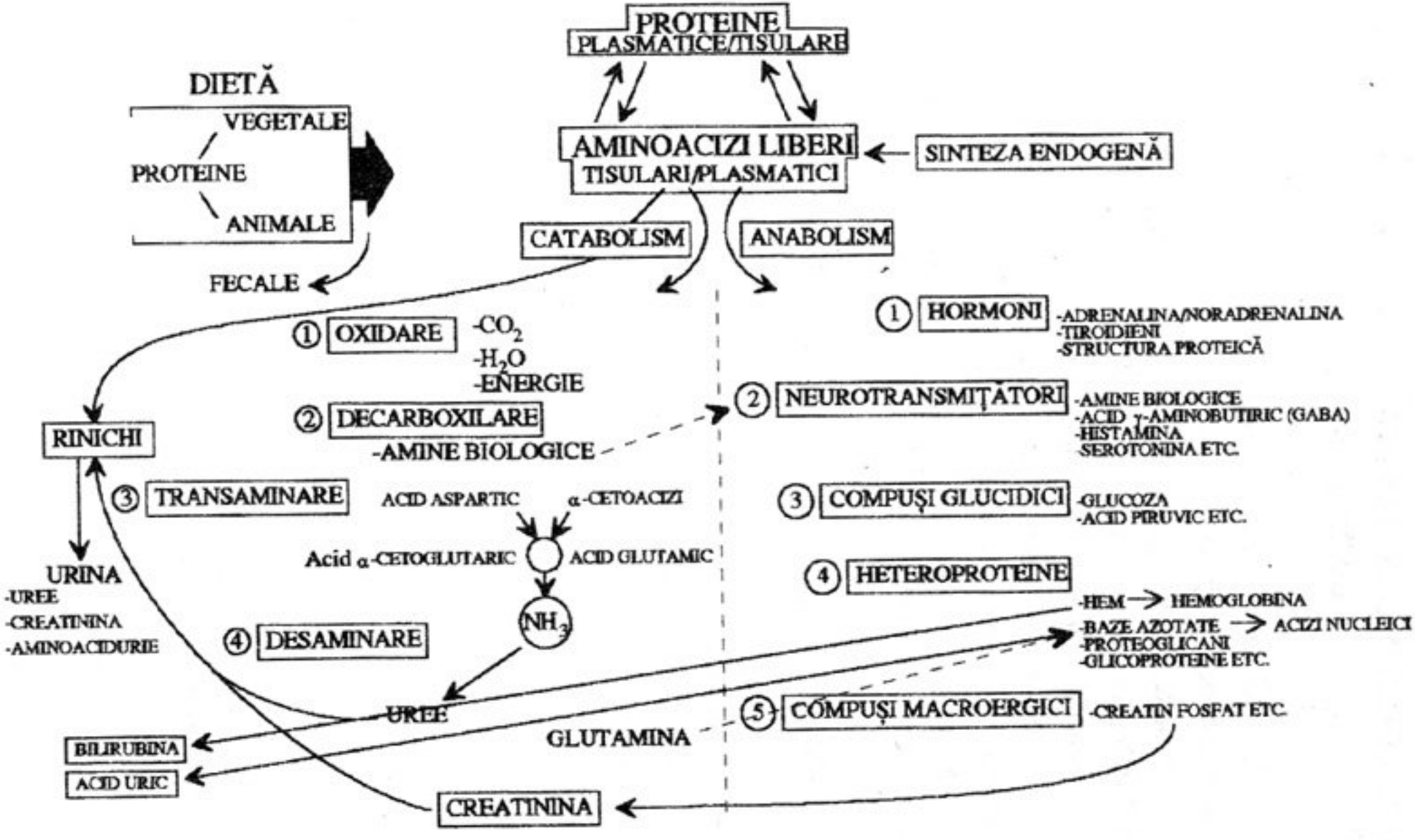



**Fig.III.1. Interacțiunile metabolice ale aminoacizilor**

Pentru adulți, determinarea aminoacidemiei și aminoaciduriei nu are valoare de diagnostic decât în cazuri rare, speciale.

## III.2. ANALIZA CANTITATIVĂ A AMINOACIZILOR DIN LICHIDE BIOLOGICE

Analiza cantitativă a aminoacizilor are drept scop, pe de o parte, determinarea conținutului total al acestor substanțe și, pe de altă parte, separarea, identificarea și dozarea fiecărui component din materialele biologice respective.

În acest scop pot fi utilizate următoarele metode:

- dozarea colorimetrică cu ninhidrină pentru aprecierea valorii aminoacidemiei și aminoaciduriei;
- cromatografia pe hârtie, coloană și silicagel pentru determinarea individuală a aminoacizilor (vezi vol.I, pag.133-142).

### *III.2.1. DOZAREA AMINOACIZILOR LIBERI (METODA STEIN-MOORE)*

**Principiu.**

După precipitarea proteinelor dintr-un material biologic, aminoacizii liberi sunt dozați cu ajutorul unei tehnici ce utilizează ca reactiv de culoare **ninhidrina** (vezi reacția vol.I, pag.215).

**Reactivi.**

1. Acetonă clorhidrică: 1 ml HCl concentrat la 99 ml acetonă. Soluția se prepară proaspăt;
2. Izopropanol 10%;
3. Reactiv de culoare format din 0,5 ninhidrină și 0,075 g hidrinden dizolvate în 18,75 ml celosolve și 6,25 ml tampon acetat 4 M, pH = 5,5;
4. Alcool etilic 50%.

**Tehnica de lucru.**

- într-o eprubetă de centrifugă se adaugă 8 ml acetonă clorhidrică și 2 ml ser;

- proteinele precipitate se separă prin centrifugare 10 minute la 5000 rotații/minut;
- supernatantul se introduce într-o capsulă de porțelan și se lasă să se evapore la temperatura camerei;
- reziduul se reia cu 5 ml izopropanol 10% din care se iau probe de 0,1, 0,2, 0,3 ml;
- probele introduse în eprubete se aduc la 1 ml cu apă distilată;
- se adaugă 0,5 ml reactiv de culoare și se țin 15 minute pe baie de apă la fierbere;
- se răcesc și se adaugă 5 ml alcool etilic 50%;
- culoarea formată se măsoară la $\lambda = 570$ nm;
- culoarea este stabilă timp de o oră;
- în paralel se face o probă martor formată din 1 ml apă distilată; +0,5 ml reactiv de culoare; se fierbe 15 minute și apoi se adaugă 5 ml alcool etilic 50%.

- **Calcul.**

$E_P - E_M = E$ - care se raportează la o curbă de etalonare, efectuată în aceleași condiții cu o soluție etalon de leucină.

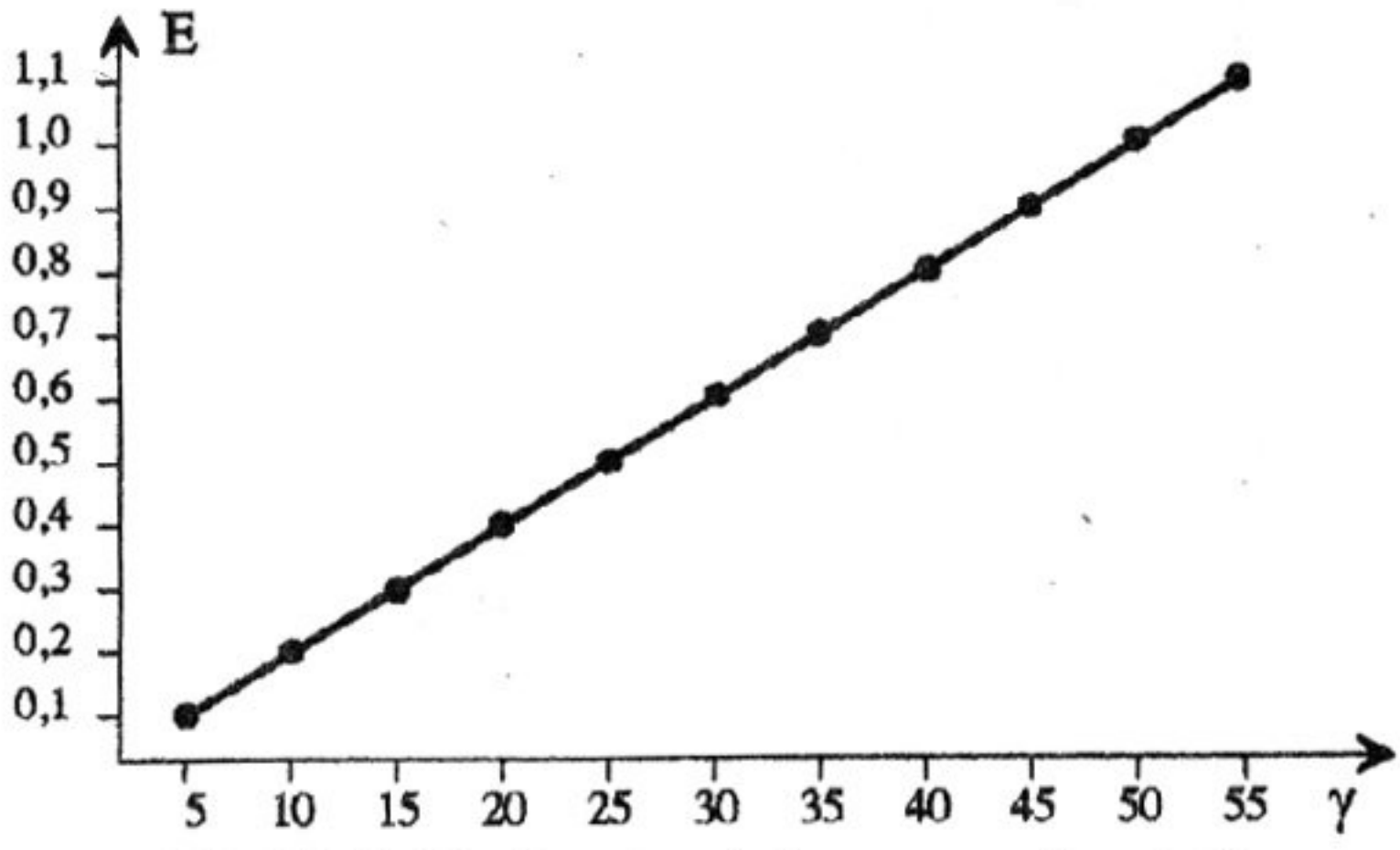



**Fig.III.2. Curba de etalonare cu leucină**

# III.3. PROTEINE PLASMATICE

## *III.3.1. FUNCȚIILE PROTEINELOR PLASMATICE*

Proteinele plasmatice sunt constituienți importanți ce participă în multe procese vitale ale organismului; formează un tot biologic bine conturat, îndeplinind în organismul uman funcții dintre cele mai diverse.

Se apreciază că în sânge sunt aproximativ **300** de **proteine** diferite cu roluri bine definite, dintre care unele nu sunt precizate încă. Concentrația lor variază dependent de vârstă, sex, diferite situații fiziologice și mai ales patologice. O parte din funcțiile biologice ale proteinelor sunt sistematizate mai jos.

- **funcție nutritivă** - proteinele plasmatice, în special albumina, care predomină din punct de vedere cantitativ, sunt utilizate ca sursă de aminoacizi, catabolizați ulterior, fie direct, fie indirect, pentru formarea glucozei din aminoacizi prin procesul de gluconeogeneză;
- **funcție plastică** - prin aceasta se înțelege rolul proteinelor plasmatice în sinteza proteinelor celulare caracteristice fiecărui țesut;
- **menținerea volumului sângelui** - albumina plasmatică asigură menținerea în circulație a unei mari cantități de apă, reglează implicit raportul hematii-plasmă (**hematocritul**), fapt ce se repercutează asupra volumului sanguin;
- **vehicul al diferitelor substanțe în sânge** - albumina fixează și transportă acizi grași liberi, diverși ioni, bilirubină, medicamente etc., globulinele, la rândul lor, fixează și transportă fier, cupru și diferite alte componente. De fracțiunile globulinice ($\alpha$, $\beta$ și $\gamma$) se leagă o serie de enzime și hormoni, ca: hormonul tireotrop hipofizar, estrogeni etc.;
- **coagularea sângelui** - printre componenții proteinelor plasmatice sunt prezenți și protrombina, proconvertina și fibrinogenul, care sunt toate elemente proteice cu rol în procesul coagulării;

◆ **balanța hidrostatică a sângelui** - datorită proprietăților lor coloidale, proteinele nu difuzează prin membrana celulară, exercitând astfel o presiune osmotică care, prin jocul de alternanță cu presiunea hidrostatică, permite un continuu transport de apă din sânge spre țesuturi și de la țesuturi spre sânge. Numai datorită acestui flux și reflux fiziologic este posibilă hrănirea țesuturilor și îndepărtarea produșilor de catabolism. Dintre proteinele plasmatice, albumina este cea care exercită cea mai mare presiune osmotică deoarece are molecula aproape sferică și absoarbe cel mai bine apa (1 g albumină absoarbe 18 ml apă). Albuminele determină 80% din presiunea osmotică a plasmei;

◆ **pH-ul sângelui** - datorită caracterului lor amfoter, proteinele circulante, împreună cu alte sisteme tampon, contribuie la menținerea pH-ului sanguin între limitele sale normale;

◆ **funcția imunologică** - proteinele plasmatice participă la imunitatea organismului; γ-globulinele au un rol predominant în procesul de imunitate al organismului, ele fiind substratul proteic al anticorpilor.

În tabelul III.3. sunt prezentate principalele proteine plasmatice și concentrațiile lor.

Tabelul III.3. **PRINCIPALELE PROTEINE PLASMATICE**

| **Migrarea electroforetică** | **Proteină** | **Concentrația plasmatică mg/dl** |
|---|---|---|
| Prealbumină | Prealbumină | 25 |
| Albumină | Albumină | 4000 |
| α-1 | α-1-antitripsina | 280 |
| | Apolipoproteina A | 200 |
| | α-1-glicoproteina acidă | 90 |
| | Componentul C9 al sistemului complement | 8 |
| | Protrombina | 5 |
| | α-1-microglobulina | 5 |
| | Factorul IX al coagulării | 1 |
| | Factorul X al coagulării | 1 |
| | Transcobalamina I | 0,3 |

| | | |
|---|---|---|
| Inter α | Proteina S/Vitronectina | 50 |
| α-2 | Haptoglobina | 300 |
| | α-2-macroglobulina | 290 |
| | α-2-glicoproteina acidă | 60 |
| | Ceruloplasmina | 35 |
| | Antitrombina III | 30 |
| | Cl inhibitorul | 24 |
| | Kininogenul | 10 |
| | α-2-plasmin inhibitorul | 6 |
| | Proteina de legare a retinolului (RBP) | 4 |
| | Proteina de legare a tiroxinei | 2 |
| β | Transferina | 260 |
| | Apolipoproteina B | 100 |
| | Componentul C3 al sistemului complement | 80 |
| | Hemopexina | 75 |
| | Componentul C4 al sistemului complement | 40 |
| | Fibronectina | 33 |
| | Plasminogenul | 20 |
| | Factorul B al sistemului complement | 8 |
| | Factorul XIII al coagulării | 3 |
| | Factorul V al coagulării | 2 |
| | Factorul VIII al coagulării | 1 |
| | β-2-microglobulina | 0,1 |
| γ | IgG | 1200 |
| | IgA | 200 |
| | IgM | 150 |
| | IgD | 10 |
| | IgE | 1 |
| | Componentul Clq al sistemului complement | 15 |
| | Prekalikreina | 1 |
| | Proteina C - reactivă | 0,5 |

## *III.3.2. INVESTIGAREA CLINICĂ A PROTEINELOR PLASMATICE. PROTEINEMIA. VARIAȚII FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGICE*

**Investigarea clinică a proteinelor plasmatice** se realizează prin următoarele probe:

- dozarea proteinelor totale plasmatice;
- dozarea albuminelor plasmatice și determinarea raportului albumine/globuline;
- dozarea fibrinogenului din plasmă;
- separarea electroforetică a proteinelor plasmatice;
- aprecierea raportului dintre fracțiunile proteice cu ajutorul testelor de disproteinemie.

Concentrația proteinelor totale serice **proteinemia** poate prezenta variații fiziologice în funcție de diferiți factori:

• vârstă; • ciclu menstrual; • sarcină; • efort; • frig; • căldură și chiar variații diurne.

Valorile normale ale proteinelor totale serice sunt consemnate în tabelul III.4. (după Radu Mihai Vasile, 1985).

Tabelul III.4. **VALORILE PROTEINELOR TOTALE PLASMATICE**

| **Proveniență** | **Vârstă** | **g/100 ml** | **Metoda de dozare** |
|---|---|---|---|
| Ser | **adulți** | **6,5-8,3** | Biuretului |
| | nou născuți | 4,8-7,3 | Biuretului |
| | copii până la 5 ani | 5,4-8,7 | Biuretului |
| | copii peste 5 ani | 6,0-8,0 | Biuretului |
| | | **mg/100 ml** | |
| LCR | lombar/adulți | 15-40 | Biuretului |
| | nou născuți | 40-120 | Biuretului |
| | copii | 15-40 | Biuretului |
| Salivă | | 200-400 | Biuretului |

Prin metoda precipitării selective, proteinele plasmatice au fost separate în următoarele fracțiuni principale:

| | | |
|---|---|---|
| Fibrinogen | 0,2-0,4 | g/100 ml |
| Albumine | 3,5-5,5 | g/100 ml |
| Globuline | 1,5-3,5 | g/100 ml |
| $\frac{\text{ALBUMINE}}{\text{GLOBULINE}}$ = 1,1-2,2 | | |

Proteinemia reprezintă una din constantele umorale ale organismului care variază în puține afecțiuni, datorită limitelor largi ale acestei constante, menținute prin mecanisme de reglare complexe, insuficient cunoscute. Se realizează un echilibru dinamic între cantitatea de proteine sintetizate continuu de anumite organe (ficat, intestin, sistem macrofagic) și cea utilizată sau depozitată în diverse organe.

Proteinemia totală, concepută ca o formă intermediară între organele proteinoformatoare și proteinele tisulare, reflectă doar aproximativ starea metabolismului proteic global.

Astfel, o creștere patologică a unei fracțiuni determină de regulă o scădere corespunzătoare a albuminei, așa încât proteinemia poate rămâne aceeași.

Prin determinarea proteinelor totale din ser sau plasmă s-au pus în evidență și stări de **hipo**- sau **hiperproteinemie**.

Există două cauze principale responsabile de variația concentrației proteinelor serice și anume:

- modificarea volumului apei din plasmă;
- modificarea concentrației uneia sau a mai multor proteine datorită unor stări patologice.

În primul caz distingem situații de **hiperproteinemie** datorată unei scăderi a volumului apei plasmatice (hemoconcentrarea), unei deshidratări sau introducerii unei cantități minime de apă sau unei pierderi excesive de apă ca urmare a unor stări de deshidratare.

De asemenea, în cazurile de **hemodiluție** se vor înregistra **hipoproteinemii**. Această situație poate fi întâlnită mai ales în cazul unor retenții saline.

Tabelul III.5. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE PROTEINEMIEI**

| **Hipoproteinemii** | **Hiperproteinemii** |
|---|---|
| • **Afecțiuni hepatice**<br>- ciroze hepatice;<br>- intoxicații cu benzen, fosfor;<br>• **Stări de șoc:**<br>- arsuri, hemoragii;<br>• **Afecțiuni renale:**<br>- glomerulonefrite;<br>- glomerulonefrite cronice;<br>• **Stări cașectice:**<br>- inaniție;<br>- gastroenterocolepatii cronice;<br>- tumori maligne;<br>• **Colagenoze.** | • **Deshidratări acute:**<br>- vărsături, diaree;<br>- diabet zaharat sau insipid;<br>- stenoze digestive înalte;<br>• **Anemie perniciaosă;**<br>• **Infecții acute și cronice;**<br>• **Mielom multiplu** (boala lui Kahler);<br>• **Hepatite virotice evolutive;**<br>• **Macroglobulinemie Waldenström.** |

În cea de a doua situație, pot fi determinate cazuri de hiperproteinemie datorită prezenței în exces în plasmă a imunoglobulinelor ca urmare a unei infecții sau hipoproteinemie ca o consecință a sintezei defectuoase în ficat a albuminei.

## III.4. METODE DE DOZARE A PROTEINELOR

Evaluarea cantitativă a proteinelor totale din lichidele biologice poate fi efectuată cu ajutorul a numeroase metode de dozare clasificate după cum urmează:

I. **Metode fizico-chimice:**

- metoda spectrofotometrică de absorbție în U.V.

II. **Metode chimice:**

- metoda biuretului cantitativă;
- metoda Lowry.

III. **Metode imunochimice** (Mancini, Hereman)

IV. **Metode turbidimetrice:**

- metoda Esbach;

- metoda Heller;
- metoda turbidimetrică.

Metodele din primele două grupe sunt utilizate mai ales la dozarea proteinelor din sânge și lichid cefalorahidian, iar cele din ultimele grupe la dozarea proteinelor urinare sau a unor proteine aflate în cantități reduse.

Metoda biuretului, care astăzi are numeroase variante, este cea mai întrebuințată metodă de dozare a proteinelor totale din lichidele biologice.

Una dintre aceste variante ale metodei biuretului este metoda descrisă de Lowry, dintre cele mai exacte și specifice modalități de determinare ale proteinelor, dar fiind mai laborioasă și mai costisitoare, nu se întrebuințează decât cu scop de cercetare.

Metoda spectrofotometrică în U.V. este rapidă, nu necesită volum mare de probe biologice și nici reactivi speciali, dar este necesară o aparatură specifică. De asemenea, nu sunt atât de sensibile ca metoda Lowry.

În continuare vor fi prezentate cele mai folosite tehnici în laboratoarele clinice.

### *III.4.1. METODA ABSORBȚIEI ÎN ULTRAVIOLET*

Trei aminoacizi - triptofanul, tirozina și fenilalanina - absorb semnificativ în ultraviolet (figura III.3.).

Deoarece majoritatea proteinelor conțin resturi de tirozină, măsurarea absorbției la **280 nm** cu un spectrofotometru este o metodă extrem de rapidă și convenabilă de estimare a conținutului proteic al unei soluții. Metoda este destul de sensibilă, dar nu riguros specifică, deoarece pot exista interferențe cu acizii nucleici care, deși au maximum de absorbție de 260 nm, au o extincție apreciabilă și la 280 nm.

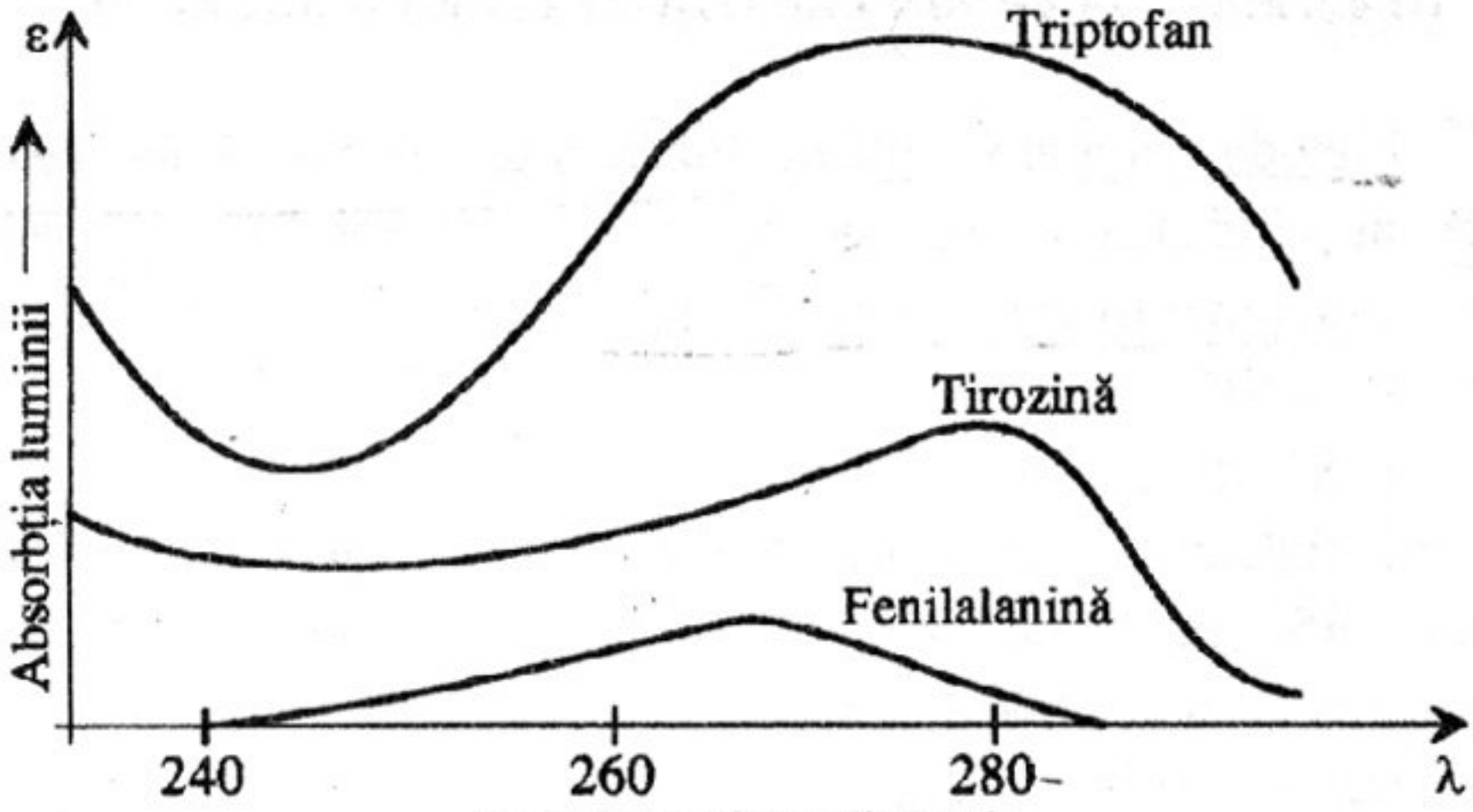



Fig.III.3. **Spectrul de absorbție în ultraviolet al triptofanului, tirozinei și fenilalaninei**

Pentru aprecierea concentrației este necesar să se traseze, în prealabil, o curbă de etalonare folosind o soluție de o concentrație cunoscută a unei proteine pure (albumina bovină serică cristalină). Această tehnică necesitând un aparat costisitor nu este utilizată decât în unitățile medicale bine utilate. Specificitatea metodei crește prin citire în zona 200-225 nm unde absorb în mod specific legăturile peptidice.

### *III.4.2. METODA LOWRY*

Metoda elaborată de Lowry și colaboratorii săi este considerată ca una dintre cele mai sensibile și precise metode de dozare a proteinelor. Metoda Lowry combină atât metoda biuretului, cât și cea a lui Folin și Ciocâlteu al cărei reactiv reacționează cu aminoacizii aromatici din structura proteinelor (tirozina și triptofanul). Metoda poate să determine între 10-60 μg/100 ml proteine din soluții sau materiale biologice și, din acest motiv, este utilizată mai puțin în analizele de rutină, practic exclusiv în scopuri de cercetare, în determinări de mare exactitate. Este de aproximativ 100 de ori mai sensibilă decât metoda biuretului.

### *III.4.3. METODA BIURET CANTITATIVĂ (WEICHSELBAUM)*

Metoda cea mai simplă de dozare a proteinelor și deci cea mai utilizată în clinică este bazată pe reacția **biuretului.** Intensitatea colorației este proporțională cu cantitatea de proteine existente.

**Reactivi.**

1. Soluție de NaOH 10%;

2. Reactiv biuret: într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml se introduc 45 g tartrat de Na și K (sare Seignette), 30 g NaOH și 15 g $CuSO_4$. Se adaugă apă până la dizolvarea completă și apoi 5 g KI. Se completează volumul cu apă distilată;

3. Soluție standard de proteină: 0,7 g albumină bovină cristalizată se dizolvă în 10 ml de ser fiziologic.

**Tehnica de lucru.**

În trei eprubete se introduc:

| Reactivi | Probă | Blanc | Standard |
|---|---|---|---|
| Ser/plasmă | 0,2 | - | - |
| Apă distilată | 1,8 | 2 | - |
| Standard de proteină | - | - | 2 |
| NaOH 10% | 1 | 1 | 1 |
| Reactiv biuret | 3 | 3 | 3 |

Se agită eprubetele și după un repaus de 30 de minute, se citesc extincțiile la 570 nm, folosind cuva cu drum optic de 1 cm.

**Calcul.**

$$\text{g proteine/100 ml} = \frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \times 700$$

**Observații.**

Drept standard se folosește soluție de albumină serică bovină cristalizată de diferite concentrații cuprinse între 6 și 8 g/100 ml.

Calculul se poate efectua și conform formulei:

$$\text{g proteine/100 ml} = (E_P - E_B) \times 18,4$$

(cifra de 18,4 reprezintă un coeficient calculat experimental și cu ajutorul căruia se poate face aprecierea cantitativă fără a se mai utiliza standard de proteină).

### *III.4.4. DETERMINAREA FIBRINOGENULUI*

Fibrinogenul, fracțiune omogenă, cu rol fundamental în coagularea sângelui, este o glicoproteină cu masă moleculară de 340000 D.

Fibrinogenul este sintetizat în celulele din ficat și măduva oaselor, într-un ritm de 50 de ori mai rapid decât albuminele.

**Principiul metodei.** Plasma se obține prin recoltarea sângelui pe anticoagulant (heparină, oxalat). Fibrinogenul din plasmă se coagulează cu exces de calciu, cheagul de fibrină se dizolvă în soluție alcalină și se dozează proteina cu metoda biuretului.

**Reactivi**

- soluție de $CaCl_2$ 0,25%;
- ser fiziologic NaCl 0,9%;
- reactiv biuret;
- soluție NaOH 3%.

**Tehnica de lucru**

- într-o eprubetă se pipetează 0,5 ml plasmă în 2,5 ml ser fiziologic;
- se adaugă 2,5 ml $CaCl_2$ 0,25%;
- se lasă 30 minute la 37ºC;
- cheagul format se extrage cu o baghetă subțire;
- se spală cu ser fiziologic;
- se usucă pe o hârtie de filtru;
- se introduce cheagul într-o eprubetă uscată;
- se adaugă 0,5 ml NaOH 3% și 3 ml reactiv biuret;
- în paralel se lucrează un blanc care conține reactivi (0,5 ml NaOH 3% și 3 ml reactiv biuret);
- repaus 30 minute la 37ºC.

$\lambda$ = 546 nm în cuva de 1 cm.

Tabelul III.6. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE FIBRINOGENULUI**

| Hiperfibrinogenemii | Hipofibrinogenemii |
|---|---|
| ◆ pneumonii; | ► pelagră; |
| ◆ pleurezii; | ► atrofia galbenă acută; |
| ◆ traumatisme; | ► scorbut; |
| ◆ intervenții chirurgicale; | ► ciroze hepatice; |
| ◆ neoplazii; | ► hepatite acute toxice; |
| ◆ afecțiuni coronariene; | ► leucoze; |
| ◆ afecțiuni cardiovasculare | ► metastaze neoplazice. |

**Calcul**

$(E_P - E_B) \cdot 2,6$ = g fibrinogen/100 ml plasmă

Valoare normală 200-400 mg/100 ml plasmă.

### *III.4.5. METODE IMUNOCHIMICE*

Se bazează pe imunodifuzia radială cu anticorpul specific inclus în geloză. Aprecierea cantitativă a proteinei precipitată în disc prin anticorpul său specific se face prin măsurarea diametrului discului de precipitare cu exprimare în mg%.

Metodele imunochimice se bazează pe precipitarea în gel de apă sau agaroză după o reacție imunologică antigen-anticorp.

Antigenul este o substanță, în general, de natură proteică, cu masă moleculară mare, străină organismului în care pătrunde. Acesta este capabil să determine biosinteza unor proteine specifice, anticorpii, cu care să reacționeze specific și sensibil și să producă reacția antigen-anticorp.

Anticorpul este o proteină specifică sintetizată după pătrunderea unui antigen în organism și care are capacitatea de a se combina numai cu antigenul corespunzător.

Anticorpii sunt **proteine** din **clasa γ-globulinelor**.

În determinările imunologice, se folosesc seruri care conțin anticorpi față de un anumit antigen obținute prin imunizarea animalelor de laborator - **antiseruri**.

Reacția antigen-anticorp este reacția de combinare care se realizează atunci când antigenul vine în contact cu anticorpul specific.

Rezultatul combinărilor situsurilor reactive ale antigelului cu cele ale anticorpului este formarea unor linii sau arcuri de precipitare.

Metodele imunochimice sunt de două feluri:

- Metode imunochimice calitative;
- Metode imunochimice cantitative.

► Metodele **calitative** permit identificarea unor proteine patologice proteine C - reactivă, componente hormonale.

În această categorie intră:

- dubla difuziune Ouchterlony;
- contraimunoelectroforeza;
- imunoelectroforeza.

► Metode **cantitative** se folosesc pentru determinarea concentrației unor proteine normale sau patologice: imunoglobuline, transferina etc.

Dintre aceste metode, cele mai folosite sunt: **imunodifuzia radială Mancini** și electroimunodifuziunea Laurell. Aceste metode se folosesc în special pentru determinări în ser și mai puțin în alte lichide biologice.

În prezent, pentru stabilirea unui diagnostic prin reacții de precipitare sau aglutinare pe baza interacțiunii antigen-anticorp se folosesc metode mai exacte ce permit vizualizarea cu ajutorul unor anticorpi marcați. În funcție de tehnica de marcare se disting mai multe tipuri de metode:

- metoda imunofluorescentă - marcarea se face cu o substanță fluorescentă;
- metode imunoenzimatice (EIA) - marcarea se face cu o enzimă (peroxidază sau fosfatază alcalină) ce se pune în evidență printr-o reacție de culoare;
- metoda radioimunologică (RIA) în care se folosesc radioizotopi, iar radioactivitatea este determinată cu un contor de scintilație.

Aceste metode se folosesc pentru dozarea unor substanțe biologice aflate în concentrație foarte mică: hormoni, α-fotoproteină, imunoglobulină E etc.

## III.5. PROTEINELE URINARE

### *III.5.1. CATEGORIILE DE PROTEINE URINARE*

La nivelul rinichilor se realizează o ultrafiltrare a proteinelor sanguine, cu o asemenea eficiență încât, deși în decursul a 24 de ore sunt filtrați aproximativ 180 l de sânge, din cele aproximativ 7 g/100 ml numai o cantitate minimă de proteine ajunge în urină. În mod normal, numai între 20-150 mg proteine sunt prezente în urina de 24 de ore, mai ales cele cu greutate moleculară mică, cu precădere albumina. Această cantitate este nedecelabilă prin metodele uzuale, deși repetăm, în 24 de ore sunt absorbite în medie de 180 x 70 = 12600 g = 12,6 kg proteine.

Prezența în urină a proteinelor într-o cantitate ce este pusă în evidență prin metodele curente denotă, în mod evident, o depășire a capacității de filtrare datorită, într-o mai mică măsură creșterii concentrației unor proteine cu greutate moleculară mică, dar, în special, ca urmare a dereglării proceselor de absorbție de la nivelul glomerulilor (glomerulo nefrită, sindrom nefritic etc.) sau a tubilor renali (intoxicații cu metale grele - plumb, mercur, cadmiu) sau alte cauze.

Prezența în urină a proteinelor într-o concentrație crescută, proteinuria, poate fi deci datorată următoarelor patru situații:

I **Proteinuria glomerulară** - când se identifică mai ales albumina.

II **Proteinuria tubulară** - caracterizată prin prezența în urină a unor proteine cu greutate moleculară mică, altele decât albumina care este și ea prezentă, precum și proteine cu greutate moleculară mare.

III **Proteinuria de supraproducție** - datorită prezenței în sânge a unei cantități anormal de ridicate de proteine cu greutate moleculară mică, de exemplu a lanțurilor ușoare ale imunoglobulinelor.

IV **Proteinurii post-renale** - ce apar ca o consecință a unei secreții anormale de proteine în traiectul urinar.

Primele două tipuri de proteinurii sunt cele mai frecvente, ultimele fiind mult mai rar întâlnite, fapt pentru care nu vom comenta decât proteinuriile glomerulare și cele tubulare.

A. **Proteinuria glomerulară** - este cea mai des întâlnită și, deoarece albumina este în majoritatea cazurilor componentă proteică principală, uneori chiar singura, acest tip mai este denumit și "**albuminurie**". Se identifică de obicei, prin utilizarea de sticks-uri (vezi teste rapide de identificare) cu ajutorul cărora se pune în evidență semicantitativ, ca urmare a schimbării culorii unei fâșii de hârtie impregnate cu reactivi, proporțional cu concentrația albuminei în urină.

Dacă această metodă semicantitativă este constant pozitivă, este necesară utilizarea unor tehnici, ca de exemplu o analiză cantitativă și calitativă exactă prin determinări colorimetrice sau turbidimetrice, respectiv prin electroforeză în gel de agaroză sau de poliacrilamidă. În afecțiunile renale însoțite de proteinurii glomerulare crește permeabilitatea glomerulară și astfel încep să apară în urină proteine cu greutate moleculară mică, mai ales albumina, astfel că raportul albumine/globuline în urină poate atinge raportul 10/1, în unele cazuri de nefroze. Atâta vreme cât aceste proteine au o anumită și egală greutate moleculară, proteinemia este denumită "selectivă". Dacă încep să treacă proteine de diferite greutăți moleculare, atunci proteinuria este numită "**neselectivă**" și denotă o leziune glomerulară gravă. În afară de proteinuria patologică distingem și proteinurii benigne funcționale, ce apar în urma unui efort fizic intens, febră, expunere la frig, sarcină, toate fiind însă tranzitorii.

B. **Proteinuria tubulară** - este datorată unei reabsorbții defectuoase la nivelul tubilor renali proximali fiind identificate în urină proteine cu greutate moleculară mică, mai ales altele decât albumina, a cărei prezență nu este excesiv de crescută. Se constată după arsuri grave, pancreatite sau ca urmare a efectelor la nivelul rinichilor a unor substanțe toxice, ca sărurile de cadmiu și ale altor ioni.

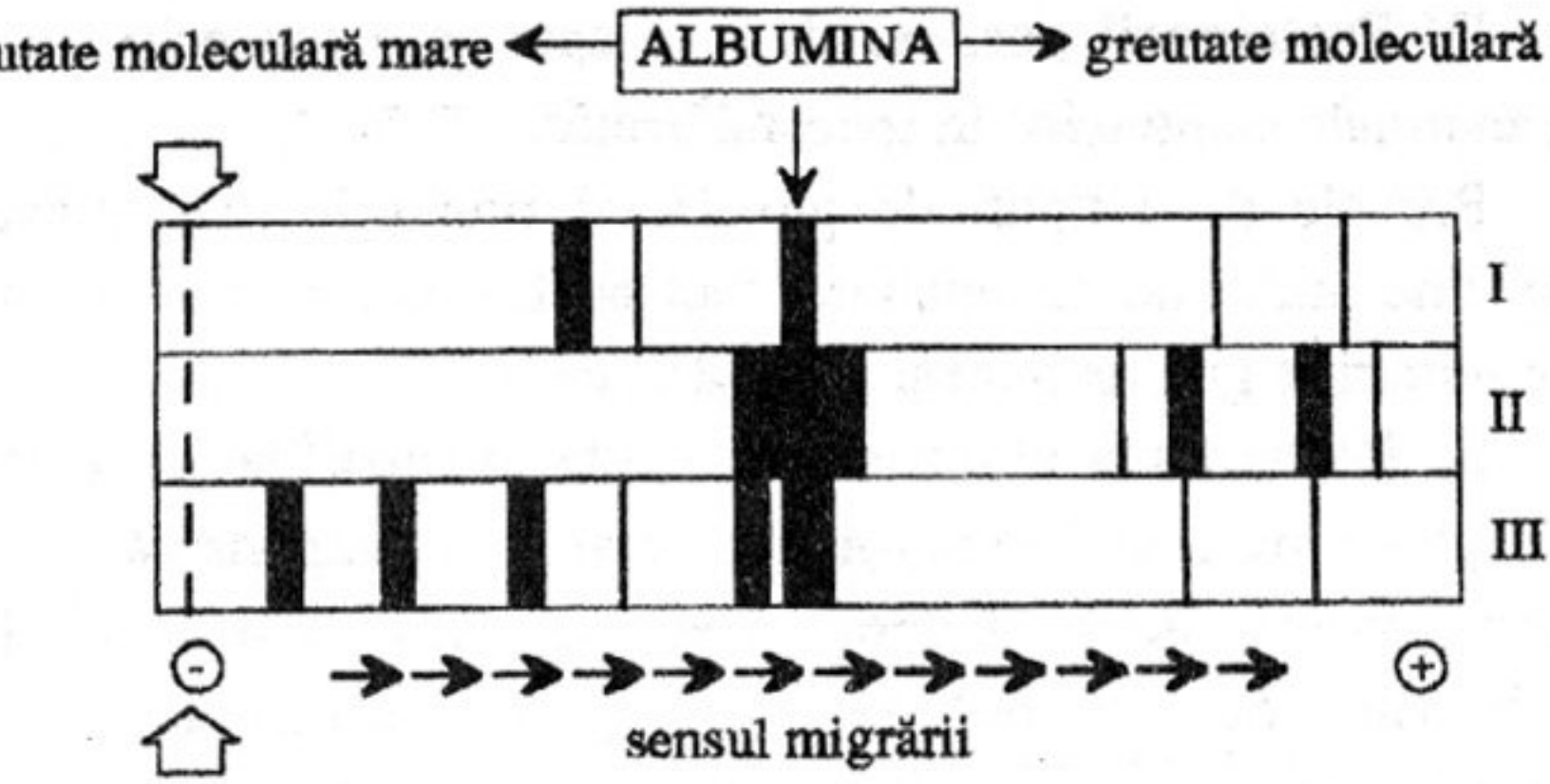



**Fig.III.3. Imaginile electroforetice ale unor proteinurii**

În figura de mai sus (figura III.3.) schematizăm imaginile electroforetice (electroforeză în gel de agaroză) tipice din proteinuriile glomerulare (II) și tubulare (III), comparativ cu acela a unei probe de urină normală (I), evident după concentrarea ei.

## *III.5.2. METODELE UTILIZATE LA DETERMINAREA PROTEINELOR URINARE*

La ora actuală, penru determinarea proteinelor totale urinare există un număr destul de mare de metode care pot fi împărțite după principiul lor general în trei categorii distincte:

- metode **colorimetrice** bazate pe utilizarea reactivului biuret;
- metode **colorimetrice** bazate pe utilizarea unor reactivi specifici;
- metode **turbidimetrice** bazate pe utilizarea unor reactivi ce precipită în mod selectiv proteinele.

Dintre acestea am selectat metoda cea mai utilizată, ca de altfel recomandată laboratoarelor clinice de către forurile internaționale de specialitate, determinarea proteinelor totale prin precipitare cu acid tricloracetic. Marele avantaj al acestei tehnici este acela că determină o precipitare nespecifică a tuturor proteinelor prezente în urină.

**Principiu**

Proteinele urinare sunt precipitate sub forma unor particule fine de către acidul tricloracetic și dozate prin turbidimetrie la lungimea de undă de 620 nm.

**Reactivi**

1. **Acid tricloracetic** TCA, 0,76 M. Se dizolvă 125 g TCA în aproximativ 500 ml apă și după dizolvare se aduce la 1000 ml.

2. **NaCl - azidă de Na.** Se dizolvă 8,5 g NaCl și 0,5 g $NaN_3$ la 1000 ml.

3. **Standard.** Drept standard se folosește un ser sau un amestec de mai multe seruri, care au un raport normal de albumine/globuline (1,3-1,8). Se determină concentrația sa proteică prin metoda biuretului. Se diluează 3 ml din acest ser până la un volum de 200 ml cu reactivul NaCl - azidă de Na. Se face din nou o determinare a concentrației proteice.

**Tehnica de lucru.**

1. Se măsoară volumul urinii de 24 ore;

2. Se iau câte 4 ml urină care se introduc în două eprubete, 1 și 2;

3. În eprubeta 1 se adaugă 1 ml numai din reactivul NaCl - azidă de Na. Se agită;

4. În eprubeta 2 se adaugă 1 ml reactiv TCA. Se agită;

5. Se lasă 10 minute la temperatura camerei;

6. Se citește la 620 nm comparativ cu proteina standard serică tratată ca la punctul 4.

**Calcul.**

$$\text{Proteine totale mg/100 ml} = \frac{A_P}{A_S} \times C_S$$

$A_P$ = extincția probei necunoscute;

$A_S$ = extincția standardului;

$C_S$ = concentrația standardului.

**Determinarea electroforetică** a proteinelor se face în condițiile descrise pentru separarea proteinelor serice, cu diferența că, în cazul unor concentrații limită de proteine urinare, este necesară în prealabil o concentrare a urinii.

## III.6. RAPORT ALBUMINE/GLOBULINE
## - ELECTROFOREZA -

**Principiul metodei.** O probă conținând proteine dintr-un material biologic este depusă pe hârtie de filtru specială, iar sub acțiunea unui câmp electric proteinele se separă în mai multe fracțiuni sau tipuri de proteine. Fracțiunile separate se evidențiază în prezența unui colorant proteinofil, individualizându-se sub formă de benzi cu poziții decalate datorită mobilității electroforetice diferite pe care o posedă. Imaginea obținută după separare și colorare poartă denumirea de **electroforegramă.**

**Materiale necesare.**

***Sursa de curent.*** Curentul de la rețea este stabilizat cu ajutorul unui redresor care furizează curent continuu. În general, redresorul trebuie să debiteze o tensiune reglabilă între 0-500 volți și o intensitate maximă a curentului de 50 mA. Redresorul este prevăzut cu un voltmetru și cu un miliampermetru necesare ajustării și stabilirii exacte a parametrilor care definesc câmpul electric aplicat pentru efectuarea electroforezei.

***Cuva de electroforeză.*** Există mai multe tipuri de cuve și sunt constituite din:

- o cutie din material plastic în care se amplasează două compartimente, unul pentru anod și celălalt pentru catod, în care se introduce soluția tampon de pH și tărie ionică cunoscute;
- electrozi de cărbune sau din sârmă de platină spiralată, care sunt dispuși în fiecare compartiment și protejați de un manșon de sticlă cu orificii, în scopul evitării unor modificări ale caracteristicilor soluției tampon (în cursul electroforezei apar produși secundari de reacție care determină polarizarea electrozilor și care pot modifica pH-ul sau tăria ionică a tamponului);

► un suport detașabil, care permite fixarea perfect orizontală a benzilor de hârtie specială de filtru (tip Whatman) pe care se realizează fracționarea proteinelor;

► un capac de sticlă înclinat, care închide etanș cuva de electroforeză și prin care se poate urmări procesul de migrare electroforetică.

***Suportul de migrare.*** Hârtie de filtru specială tip Whatman nr. 1 (sau alte tipuri: Schlleicher-Schüll, Munktell-Nagel etc.) sub formă de benzi cu dimensiunile de 3/30 cm. Hârtia de electroforeză trebuie să prezinte o structură omogenă și o grosime identică pe toată suprafața, precum și o absorbție minimă și egală pentru diferitele fracțiuni proteice separabile.

***Dispozitiv automat sau fotometru pentru evaluarea cantitativă.*** Electroforegramele, respectiv fracțiunile separate, se pot evalua cantitativ prin două procedee: prin **fotometrare directă a electroforegramei**, utilizând un densitometru (integrator) automat și obținerea curbei respective din care se calculează procentul fiecărei fracțiuni separate sau prin **decuparea spoturilor colorate**, eluția lor și determinarea extincției la fotometru.

**Reactivi.**

1. Soluția tampon de pH 8,6 și $\mu = 0,05$: acid dietilbarbituric (barbital) 1,84 g, sarea de sodiu a acidului dietibarbituric (dietilbarbiturat) 10,3 g; se aduce la un litru cu apă distilată;

2. Soluție de relevare: albastru de bromfenol 0,01 g, sulfat de zinc ($ZnSO_4$);

3. Soluție de spălare: acid acetic 5%;

4. Soluție de eluare (eluent): $Na_2CO_3$ (cristalizat) 10%; soluția de carbonat de sodiu se amestecă în volume egale cu metanol (metanolul se adaugă în porțiuni mici, sub agitare, pentru evitarea precipitării);

5. Proba de analizat: proteine din serul sanguin provenit de la diferite specii de animale.

**Tehnica de lucru.**

Aplicarea probei:

◆ pe benzi de hârtie de filtru specială, cu dimensiunile menționate anterior, se marchează transversal, cu creionul, linia de start, adică poziția de aplicare a probei supusă analizei electroforetice (aproximativ la 8 cm distanță de unul din capetele benzii);

◆ se introduc benzile de hârtie în soluția tampon pentru electroforeză; se elimină excesul de lichid prin tamponarea benzilor cu hârtie de filtru obișnuită;

◆ se introduc volume egale din soluția tampon în cele două compartimente ale electrozilor;

◆ se controlează și, eventual, se corectează orizontalitatea cuvei;

◆ se întind benzile în poziție perfect orizontală pe suportul amplasat în cuva de electroforeză, imersându-se capetele lor în tamponul conținut în cele două compartimente ale electrozilor;

◆ se lasă să circule curentul electric timp de 15 minute, pentru echilibrare;

◆ capătul benzilor prevăzut cu linia de start se amplasează spre catod, deoarece direcția de migrare a proteinelor va fi spre anod (pH-ul tamponului fiind în domeniu alcalin, proteinele se vor încărca electronegativ);

◆ se aplică cu o micropipetă 10 µl din proba de ser; aplicarea se face prin mișcări liniare repetate ale vârfului micropipetei de-a lungul liniei de start marcată în prealabil cu creionul (se evită aplicarea probei până la marginile benzii).

***Migrarea.***

• se închide cuva cu capacul respectiv, se conectează redresorul la sursa de curent și se stabilesc parametrii curentului electric (tensiunea și intensitatea);

• tensiunea (diferența de potențial) se calculează prin raportare la lungimea benzii de hârtie, iar intensitatea curentului prin raportare la lățimea benzilor de hârtie; în general, pentru evitarea efectelor calorice care antrenează evaporarea tamponului de pe benzi, este recomandabil ca tensiunea să nu depășească 10 V/cm, iar intensitatea 2,5 mA/cm;

• după scurgerea timpului de migrare, se întrerupe curentul și se scoate din cuvă suportul cu benzile de hârtie care se usucă la temperatura ambiantă timp de 30 de minte;

• ulterior, benzile de hârtie se introduc în etuvă la 110ºC și se mențin timp de 15 minute pentru fixarea prin coagulare a proteinelor separate.

***Colorarea.***

▪ benzile de hârtie de filtru se imersează într-o cuvă conținând soluția de revelare (albastru de bromfenol) cu care se lasă în contact timp de cel puțin 30 de minute;

▪ se îndepărtează colorantul și se adaugă soluția de spălare; se repetă de câteva ori operația de spălare până ce fondul hârtiei devine incolor; prin îndepărtarea excesului de colorant nereținut de fracțiunile proteice, aceste fracțiuni apar individualizate sub formă de benzi colorate în albastru;

▪ ulterior, benzile de hârtie de filtru, pe care sunt etalate fracțiunile proteice, se usucă la temperatura ambiantă;

▪ după uscare, benzile se trec prin vapori de amoniac care schimbă culoarea indicatorului, fracțiunile proteice separate devenind albastru-violete.

**Interpretarea electroforegramelor.**

Electroforegrama obținută prin separarea proteinelor serice se compune din 5 fracțiuni sau tipuri de proteine: o fracțiune tip albumină și patru fracțiuni tip globuline ($\alpha_1$, $\alpha_2$, $\beta_{1+2}$, $\gamma$).

În ordinea mobilității electroforetice (exprimată orientativ ca diferența în cm de la linia de start până la mijlocul fiecărei fracțiuni separate), aceste fracțiuni sunt următoarele: albumină; $\alpha_1$–globuline; $\alpha_2$–globuline; $\beta_{1+2}$–globuline; $\gamma$–globuline.

În figura III.4. este reprezentată distribuția celor cinci fracțiuni menționate. Albumina este o fracțiune omogenă, având cea mai mare mobilitate electroforetică, γ-globulinele prezintă mobilitatea cea mai mică, iar fracțiunile $\alpha_1$, $\alpha_2$ și β–globulinele posedă o mobilitate electroforetică intermediară.

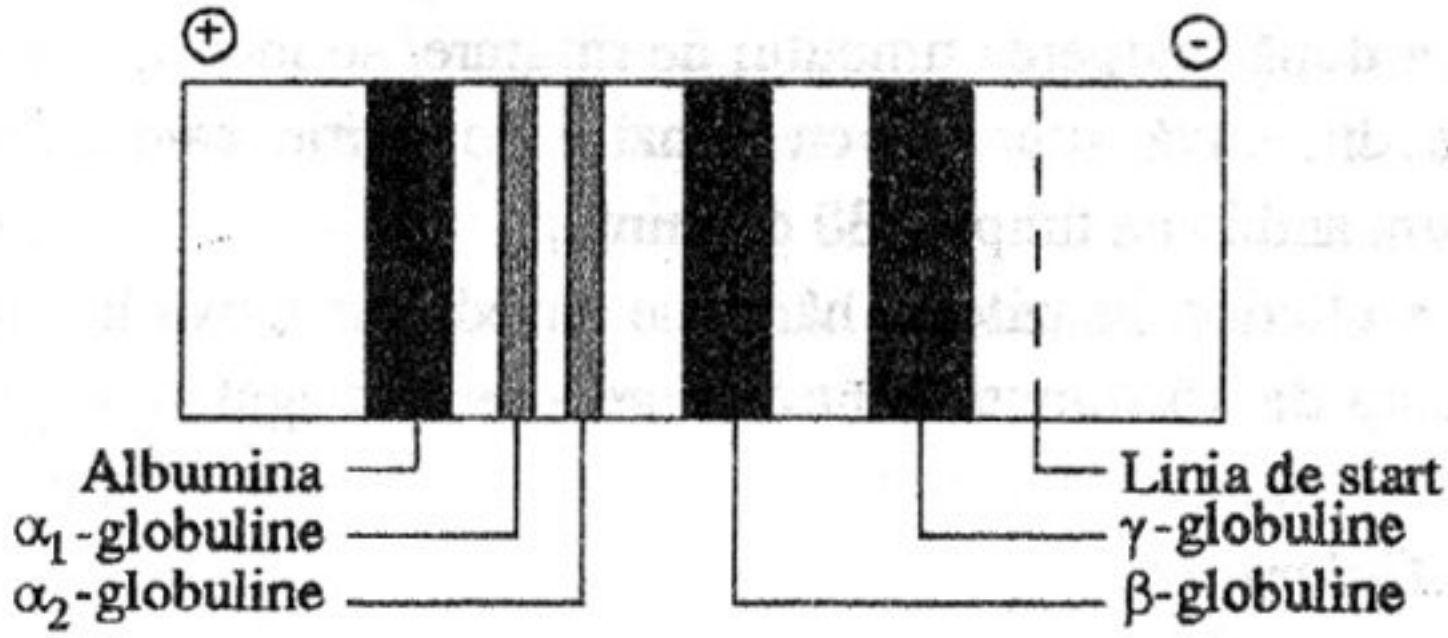



Fig.III.4. **Fracționarea proteinelor serice prin electroforeză pe hârtie (electroforegramă)**

**Evaluarea cantitativă a electroforegramelor.**

Pe electroforegrama obținută se trasează cu creionul conturul fiecărei fracțiuni colorate.

► se decupează cu foarfecele fiecare fracțiune, tăindu-se suprafața respectivă de hârtie de filtru în porțiuni mici;

► porțiunile de hârtie corespunzătoare fiecărei fracțiuni se introduc în eprubete separate, pentru eluarea colorantului reținut de fracțiunea respectivă;

► în fiecare din cele cinci eprubete se pipetează 3 $cm^3$ soluție de eluare;

► se astupă eprubetele și se lasă timp de 30 de minute pentru eluarea colorantului; în acest interval de timp, eprubetele se agită de câteva ori;

► se determină fotometric, la $\lambda = 570$ nm, extincția lichidului colorat obținut după eluare;

► se calculează valorile procentuale ale fiecărei fracțiuni proteice separate electroforetic, după următoarea formulă:

$$X = \frac{E \cdot 100}{\Sigma}$$

în care: X este valoarea procentuală a fiecărei din cele cinci fracțiuni proteice separate; E = extincția determinată a fracțiunii X; $\Sigma$ = suma extincțiilor celor cinci fracțiuni (considerată 100%).

**Observație.**

Se constată că, în raport cu toate celelalte fracțiuni de tip globuline, valoarea procentuală a fracțiunii albumină reprezintă peste 50%. Se calculează raportul albumină/globuline $\left(\frac{A}{G}\right)$ obținut din relația:

$$\frac{A}{G} = \frac{\text{E Albumina}}{\Sigma \text{ E Globulină}} \quad \text{sau} \quad \frac{A}{G} = \frac{\text{procent albumină}}{\Sigma \text{ procente globuline}}$$

**Observație.** Valoarea raportului $\frac{A}{G}$ este supraunitară în condiții normale. În anumite cazuri patologice valoarea acestui raport se modifică. Cu datele astfel obținute se întocmește următorul tabel și se interpretează valorile:

Tabelul III.7. **EVALUAREA ELECTROFOREGRAMELOR**

| **Fracțiuni proteice** | **Extincții (E)** | **Σ E** | **% fracțiune** | **Σ E** | **Raportul (A/G)** |
|---|---|---|---|---|---|
| Albumină | | | | | |
| $\alpha_1$–globuline | | | | | |
| $\alpha_2$–globuline | | | | | |
| β–globuline | | | | | |
| γ–globuline | | | | | |

În urma determinării cantitative a celor cinci fracțiuni electroforetice convenționale s-au precizat valorile medii ale concentrațiilor lor și valorile procentuale raportate la proteinele plasmatice totale.

Precizăm că, în prezent, sunt utilizate în mod curent alte suporturi pentru electroforeză, ce permit separări mult mai eficiente: folii de acetat de celuloză sau geluri de poliacrilamidă sau agaroză.

Tabelul III.8. **LIMITELE DE VARIAȚIE ALE FRACȚIUNILOR ELECTROFORETICE CONVENȚIONALE**

| Fracțiunea | g/100 ml | Procente relative |
|---|---|---|
| Proteine totale | 6,3-8,5 | |
| Albumine | 3,5-5,5 | 52-68 |
| Globuline | 1,3-3,5 | 32-48 |
| $\alpha_1$–globuline | 0,2-0,4 | 2,4-5,3 |
| $\alpha_2$–globuline | 0,5-0,9 | 6,6-13,5 |
| β–globuline | 0,6-1,1 | 8,5-14,5 |
| γ–globuline | 0,7-1,7 | 10,7-21,0 |

În funcție de natura suportului de separare, limitele normale de variație ale fracțiunilor electroforetice prezintă anumite diferențe.

Tabelul III.9. **LIMITELE DE VARIAȚIE A FRACȚIUNILOR ELECTROFORETICE PE DIVERSE SUPORTURI**

| Fracțiunea | Masa moleculară | Acetat de celuloză | Gel de agar | Hârtie |
|---|---|---|---|---|
| Albumine | 65000-69000 | 58-66 | 50-60 | 52-68 |
| $\alpha_1$–globuline | 45000-200000 | 3-5 | 3-5 | 2,4-5,3 |
| $\alpha_2$–globuline | -150000 | 5-9 | 12-14 | 6,6-13,5 |
| β–globuline | variabilă | 6-14 | 10-12 | 8,5-14,5 |
| γ–globuline | -156000 | 10-24 | 18-22 | 10,7-21,0 |

Cele cinci fracțiuni electroforetice nu reprezintă proteine omogene, ci suma a nenumărate proteine, deoarece se apreciază că în mod normal în plasmă sunt prezente aproximativ 300 de proteine diferite. Majoritatea dintre ele nu îndeplinesc funcții biologice la nivelul sângelui, reprezentând proteine care depășesc bariera pe care o constituie membranele celulare tisulare. Organul cu cele mai importante roluri în sinteza și catabolizarea proteinelor plasmatice este ficatul, menționând, de exemplu, că o serie de proteine plasmatice sunt sintetizate exclusiv în ficat, ca de pildă albumina.

Așa cum vom arăta ulterior, dintre aceste numeroase proteine plasmatice, în afară de enzime, câteva au o mare valoare diagnostică.

Am selecționat câteva dintre ele, iar din figura III.5. reiese și cu ce fracțiune convențională migrează.

Informația medicală pe care o aduce electroforeza este de prim ordin, deoarece variațiile cantitative ale celor cinci fracțiuni pot indica în mod exact o serie de situații patologice în diverse afecțiuni.

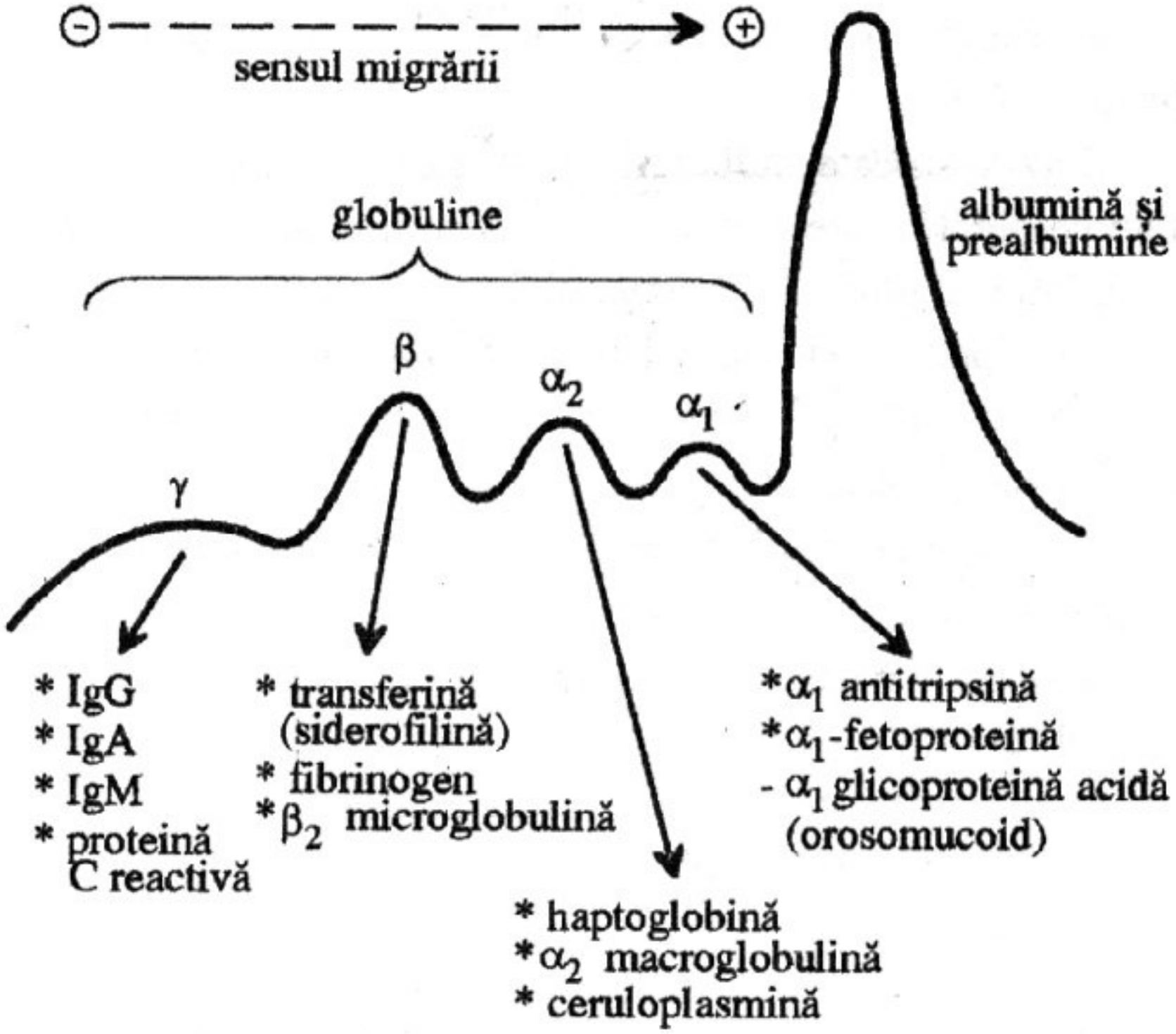



Fig.III.5. **Câteva dintre proteinele plasmatice de interes în patologie și localizarea lor în funcție de zona în care migrează**

## III.7. TESTE DE DISPROTEINEMIE

Între diversele proteine plasmatice din organismul uman sănătos există un echilibru dinamic care este reglat prin mecanisme de control de mare finețe.

Acest echilibru dinamic depinde nu numai de cantitatea totală de proteine, ci și de anumite raporturi cantitative între diferitele componente.

În diverse stări patologice pot surveni următoarele modificări:

- variații ale cantității totale de proteine (**hipo** sau **hiperproteinemie**);
- modificări ale raporturilor cantitative dintre diferitele componente (**disproteinemii**);
- apariția unor proteine atipice absente în plasma normală (**paraproteinemii**).

Uneori, aceste tulburări sunt asociate. Serul determină o stabilitate coloidală, care depinde de existența unui raport normal bine determinat între albumine și globuline.

Principala fracțiune care contribuie la stabilitatea solului plasmatic, având un rol protector, este fracțiunea albuminelor cu molecule sferice și puternic hidrofile.

O micșorare a albuminemiei, asociată frecvent cu o creștere compensatoare a unei fracțiuni globulinice $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ determină o labilizare a serului, creează posibilitatea floculării proteinelor în condiții în care serul normal este stabil.

Modificările raportului albumine/globuline pot fi puse în evidență prin dozările lor chimice, electroforetic sau cu ajutorul testelor de disproteinemie.

Investigarea clinică a proteinelor plasmatice mai utilizează în mod curent în laborator testele de disproteinemie, acestea fiind metode simple și rapide deși aceste teste nu sunt specifice și nu au sensibilitate ridicată. Într-un ser care conține un raport albumine/globuline între limitele fiziologice, soluțiile coloidale sunt menținute în soluție, dar soluția va deveni opalescentă dependent de gradul de modificare a acestui raport.

Deoarece **ficatul** este sediul sintezei majorității proteinelor serice, testele de disproteinemie sunt în primul rând indicatori ai funcției hepatice, din această cauză se numesc și **teste hepatice.**

Testele de disproteinemie pot indica o afecțiune hepatică acută sau diverse alte situații patologice, ca diverse procese infecțioase sau

tulburări însoțite de dislipidemii. În prezent aceste teste tind să fie total înlocuite de dozări mai exacte ale diferitelor proteine sau de o caracterizare a raportului albumine/globuline prin alte metode (electroforeza pe folii de poliacetat de celuloză).

Testele de disproteinemie au o valoare strict orientativă dar simplitatea și reproductibilitatea lor le fac să fie foarte utilizate în laboratoarele clinice.

În funcție de tipul modificării cantitative a proteinelor plasmatice, testele de disproteinemie se clasifică astfel:

I. Teste de labilitate coloidală care evidențiază modificarea raportului albumine/globuline.

- reacția Weltmann cu clorură de calciu;
- reacția Takata-Ara cu clorură mercurică.

II. Teste ce evidențiază modificarea concentrației **α-globulinelor.**

III. Teste ce evidențiază modificarea concentrației **β-globulinelor.**

IV. Teste ce evidențiază modificarea concentrației **γ-globulinelor.**

- reacția MacLagan cu timol.

**Condiții esențiale.** Testele de disproteinemie se efectuează numai cu ser proaspăt și nehemolizat.

### *III.7.1. REACȚIA TAKATA-ARA (MODIFICATĂ DE MANKE SOMMER)*

**Principiul metodei.**

Soluția coloidală de oxid de mercur rezultată în urma reacției:

$$HgCl_2 + Na_2CO_3 \rightarrow HgO + CO_2 + 2NaCl$$

este menținută în soluție de către albumina serică ce acționează ca un coloid protector. În cazul schimbării raportului albumine/globuline în favoarea globulinelor, acțiunea protectoare a albuminelor nu se mai exercită, așa că soluția va deveni tulbure.

**Reactivi.**

1. Ser fiziologic (NaCl 0,85 g%);
2. Soluție de carbonat de sodiu anhidru 10%;
3. Soluție de clorură mercurică 0,25%.

**Tehnica de lucru.**

Se pipetează într-o eprubetă 0,1 ml ser nehemolizat, 5 ml ser fiziologic, 0,4 ml carbonat de sodiu 10% și 0,5 ml soluție de clorură mercurică 0,25%.

Se agită conținutul eprubetei și după 10 minute se citește turbiditatea la un Spekol prevăzut cu dispozitiv pentru turbidimetrie (T) utilizând lungimea de undă de 660 nm și cuva cu drum optic de 1 cm.

Cifrele obținute se interpretează astfel:

| T | Evaluare | T | Evaluare |
|---|---|---|---|
| 100-80 % | negativ - | 70-50% | slab pozitiv + |
| 80-70% | dubios +- | 50-30% | pozitiv ++ |
| | | sub 30% | intens pozitiv +++ |

Pentru transmisia T = 100-80% raportul A/G este normal.
T < 70%, raportul A/G este modificat.

### *III.7.2. REACȚIA MAC-LAGAN (TESTUL TIMOL)*

**Principiul metodei.**

Soluția saturată de timol tamponată la pH 7,8 se tulbură la adăugarea unei cantități de ser, ca urmare a formării unei combinații complexe constituită din timol-γ-globuline-fosfolipide- colesterol. Intensitatea reacției crește cu creșterea conținutului în γ-globuline.

**Reactivi.**

Soluție de timol în tampon veronal pH = 7,8. Într-un balon cotat de 500 ml se introduc 1,03 g veronal sodic și se aduce la semn cu apă distilată. La 100 ml din această soluție tampon se adaugă 1 ml dintr-o soluție de timol 10 g/100 ml alcool etilic 96º. Amestecul se agită, se încălzește și se filtrează după 24 de ore.

**Tehnica de lucru.**

Într-o eprubetă se adaugă 5 ml soluție timol și o picătură de ser nehemolizat. Se agită și se lasă în repaus 30 de minute. Se citește turbiditatea la 610 nm. Rezultatul se exprimă în unități fotometrice (UF) care se calculează conform formulei:

$$100 - T = UF.$$

Valori normale: **5-25 UF**

În unități Mac-Lagan valorile normale sunt:

1-5 UML (1 UML = 5 UF)

# IV. COMPUȘI AZOTAȚI NEPROTEICI

## IV.1. GENERALITĂȚI

În organismul uman și animal, catabolismul proteinelor determină zilnic formarea unei cantități apreciabile de substanțe azotate ce trebuie eliminate. Substanțele eliminate (amoniac, uree, creatinină, acid uric) mai ales pe cale renală constituie "**deșeuri metabolice**" care nu mai pot îndeplini nici un rol în complexa instalație biochimică a organismului uman.

Tabelul IV.1. **METABOLIȚI AZOTAȚI URINARI**

| **Metabolitul** | **Originea biochimică** | **Utilitatea clinică a determinării** | **Procent din azotul urinar neproteic** | **Concentrația normală** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **Ser/100 ml** | **Urină/24 h** |
| Aminoacizi | Proteine endogene și exogene | •boli hepatice<br>•boli genetice;<br>•afecțiuni renale tubulare | < 1 | 3,2-5,5 mg | 50-200 mg |
| Amoniac | Aminoacizi | •boli hepatice cronice;<br>•boli renale congenitale sau dobândite | 10-20 | sânge venos 40-110μg<br>sânge arterial 15-45 μg | 140-1500 mg |
| Uree | Amoniac | •boli hepatice<br>•boli renale | 55-90 | 10-40 mg | 12-40 g |
| Creatinină | Creatină | •funcția renală<br>•boli musculare | 2-3 | 0,5-1,1 mg | 700-1700 mg |
| Acid uric | Acizi nucleici | •tulburări în sinteza proteinelor | 1-1,5 | 3,0-6,5 mg | 300-700 mg |

În tabelul IV.1. prezentăm metaboliții care reprezintă peste 90% din compușii azotați urinari neproteici, dar care sunt rezultatul catabolismului proteinelor și heteroproteinelor. Pentru comparație și înțelegere sunt consemnate atât valorile normale în sânge și urină cât și proveniența acestora. Valorile procentuale sunt prezentate intuitiv în figura IV.1.

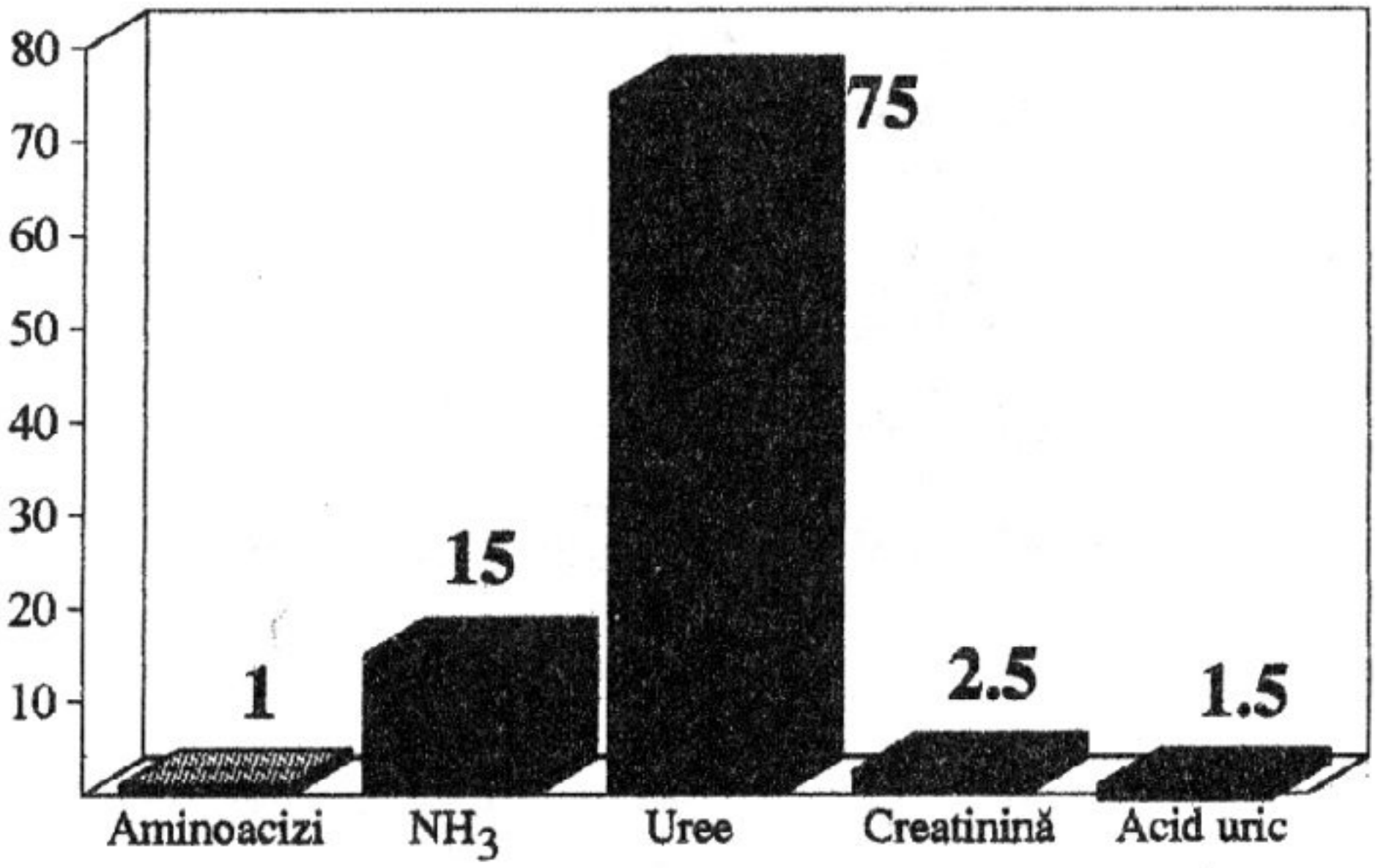



Fig.IV.1. **Repartiția procentuală a principalilor cataboliți proteici**

Schema formării principalilor cataboliți proteici și proporția de azot neproteic cu care participă acești compuși ce se elimină prin urină este prezentată în figura IV.2.

Determinarea azotului neproteic se face în filtratul obținut prin deproteinizarea serului sau plasmei, proces realizat cu: acid tricloracetic, acid percloric, acid fosfotungstic, acid sulfosalicilic.

În clinică are valoare diagnostică cunoașterea concentrației **N-neproteic** total, **N-ureic** și diferența dintre aceste valori denumită **azot rezidual** (N rezidual = N-neproteic total – N-ureic).

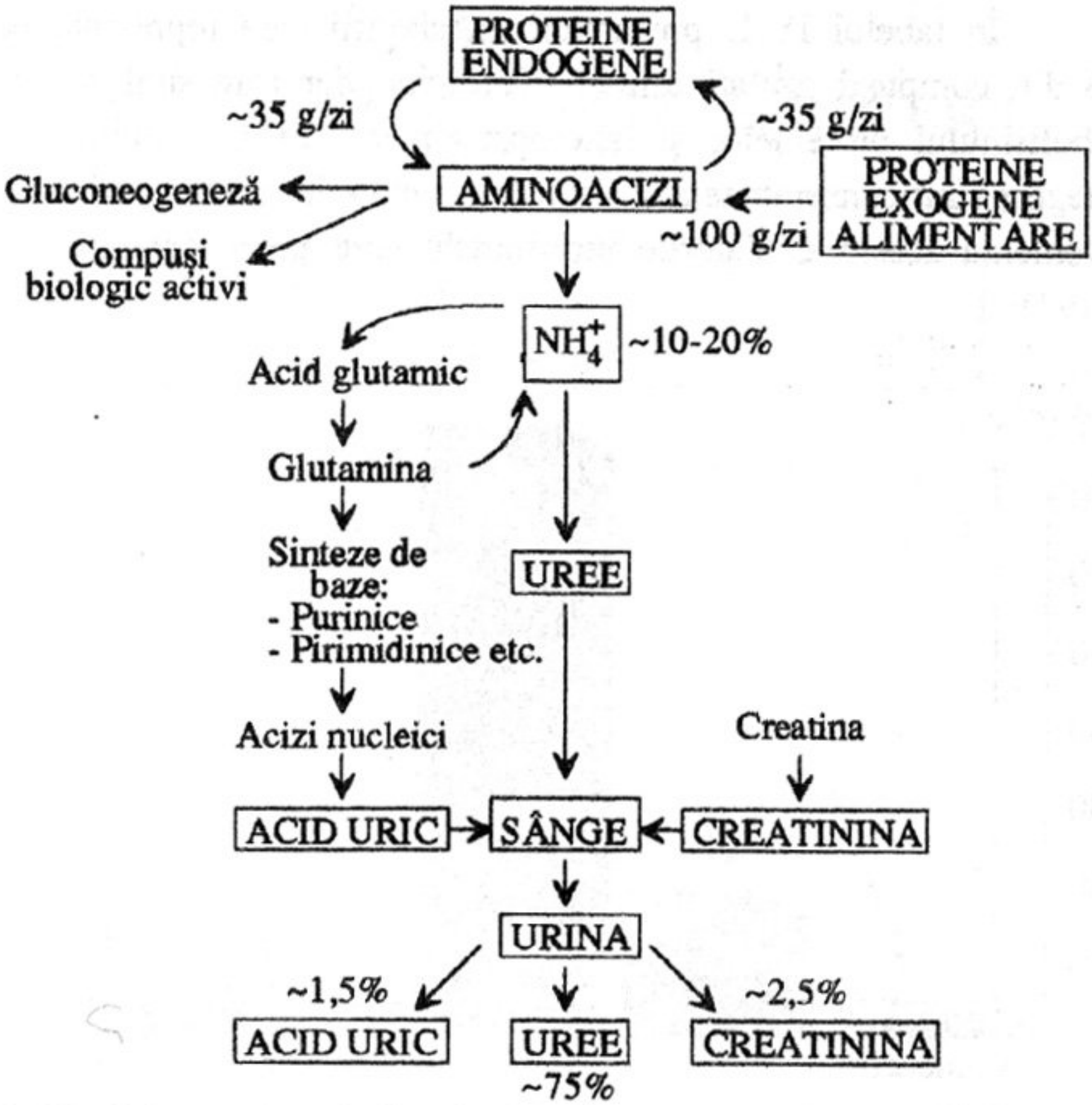



**Fig.IV.2. Schema formării principalilor cataboliți ai metabolismului proteic**

## IV.2. UREEA

### *IV.2.1. GENERALITĂȚI*

Ureea este principalul produs metabolic al catabolismului proteic, reprezentând circa 75% din compușii neproteici azotați ce se excretă prin urină.

Biosinteza sa este o consecință fiziologică pentru contracararea efectului toxic al amoniacului, care se încorporează astfel într-o substanță netoxică solubilă în apă, forma de eliminare, în special pe cale renală, a azotului aminic excedentar.

Peste 90% din uree se îndepărtează prin rinichi la nivelul glomerulului și, în mod normal, 40-70% din uree depășește pasiv tubii renali.

Biosinteza are loc în exclusivitate în ficat prin procesul de ureogeneză, amoniacul provenind în cea mai mare parte din acidul glutamic supus procesului de dezaminare oxidativă sub acțiunea enzimei glutamatdehidrogenaza.

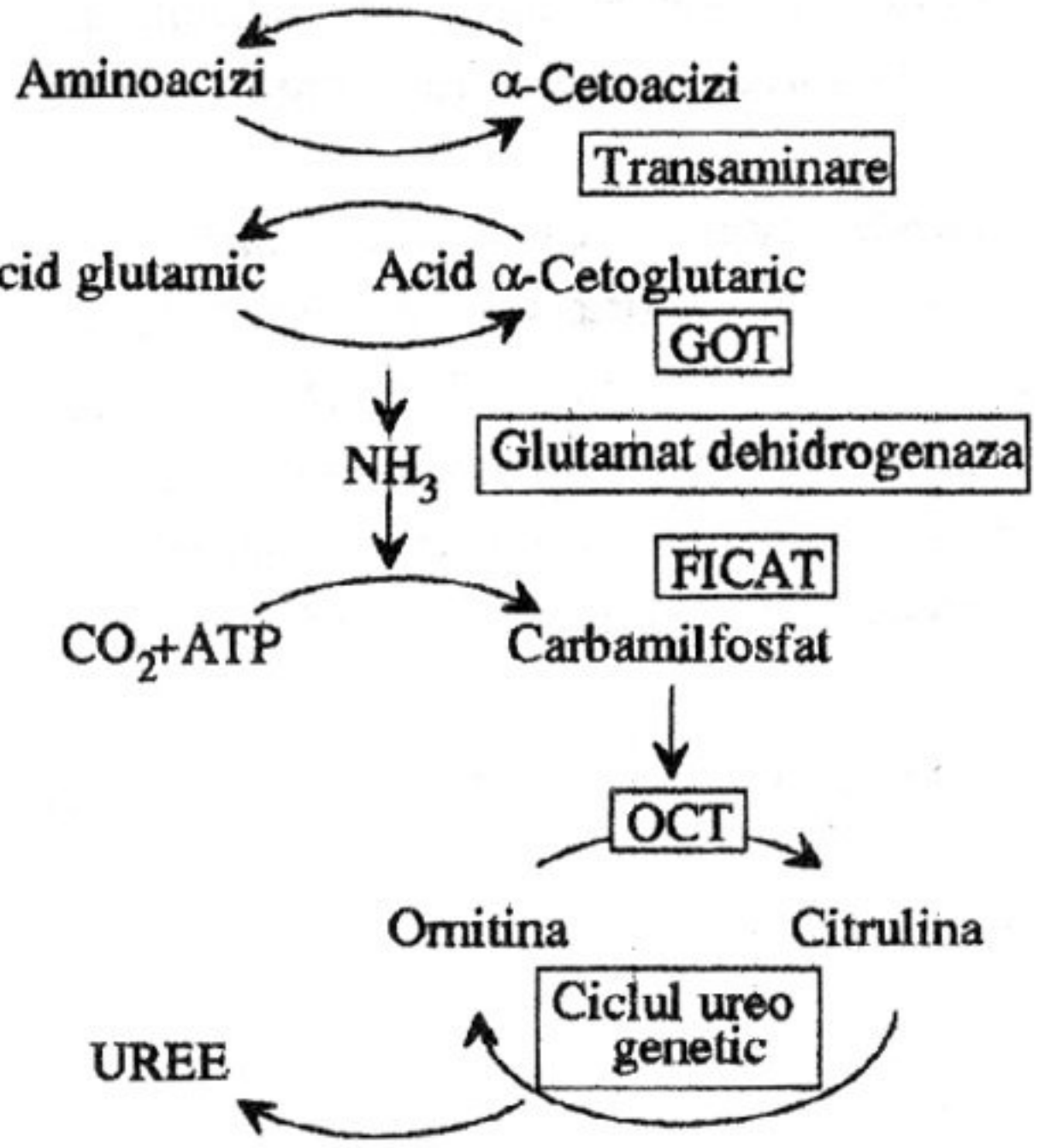



Fig.IV.3. **Schema sintezei ureei**

Succesiunea reacțiilor implicate în geneza ureei sunt schematizate în figura IV.3. din care reiese că în acest proces complex sunt implicate mai multe procese:

- transaminarea;
- dezaminarea oxidativă;
- fosforilarea oxidativă;
- ureogeneza.

Formarea ureei este dependentă într-o mare măsură de:

- dietă (cantitatea de proteine din alimente);
- acțiunea normală a enzimelor implicate în ureogeneză;

◆ integritatea funcțiilor hepatice.

Eliminarea ureei este dependentă, în special, de buna funcționare a rinichilor, astfel încât afecțiuni diverse, ca cele glomerulare, tubulare sau interstițiale renale vor induce tulburări în filtrarea ureei și, în consecință, vor determina creșterea concentrației sale în sânge.

Valoarea semiologică a nivelului ureei este dată de faptul că acumularea sa în plasmă este un indice de insuficiență renală, deși există numeroși factori extrarenali care-i influențează sinteza și concentrația sanguină.

Din aceste motive, de o mai mare utilitate clinică este determinarea raportului cantitativ **uree** (mg/100 ml ser)/**creatinină** (mg/100 ml ser), care pentru un individ normal este 12-16.

■ un raport < 12 denotă o necroză tubulară acută, o alimentație proteică deficitară, o afecțiune cronică gravă, sinteză deficitară de uree;

■ un raport > 16 denotă cu precădere o afecțiune **renală.**

### *IV.2.2. VALORI NORMALE ȘI VARIAȚII FIZIOPATOLOGICE*

Nivelul ureei serice (uremia) prezintă variații fiziologice dependent de o serie de factori:

► **vârstă** - nivelul ureei sanguine crește cu vârsta;

► **sex** - se întâlnesc concentrații mai mari la bărbați;

► **dietă** - o masă bogată în proteine crește uremia;

► **diureza** - hemoconcentrarea determină creșterea uremiei;

► **sarcină** - poate diminua nivelul uremiei.

Valorile normale ale ureei serice și urinare sunt prezentate în tabelul IV.2 (după Radu Mihai Vasile, 1986).

Interpretarea rezultatelor analitice ce depășesc valoarea de 40 mg/100 ml, trebuie să fie corelată cu alte teste de explorare a funcției renale (testul cu bromsulfonftaleină), clearance de uree, clearance de creatinină endogenă.

Tabelul IV.2. **VALORILE NORMALE ALE UREEI**

| **Proveniență** | **Vârstă** | **mmol/l** | **mg/ 100 ml** | **Metoda de dozare** |
|---|---|---|---|---|
| sânge, ser, plasmă | copil sugar | 1,67-4,16 | 10-25 | enzimatică |
| | copil 1-8 ani | 2,50-5,83 | 15-35 | enzimatică |
| | copil 8-18 ani | 3,33-5,50 | 20-33 | enzimatică |
| | **adulți** | 2,50-6,66 | **15-40** | enzimatică |
| LCR | adulți | 1,17-2,66 | 7-16 | enzimatică |
| suc gastric | adulți | 0,67-2,66 | 4-20 | enzimatică |
| | | mmol/dl | g/24 h | |
| urină | copii 1 săptămână | 2,5-3,3 | 0,15-0,20 | enzimatică |
| | 1 lună | 10-17 | 0,6-1 | enzimatică |
| | 6-12 luni | 33-67 | 2-4 | enzimatică |
| | 1-2 ani | 67-133 | 4-8 | enzimatică |
| | 4-8 ani | 133-200 | 8-12 | enzimatică |
| | 8-18 ani | 200-333 | 12-20 | enzimatică |
| | **adulți** | 220-669 | **13,2-36,6** | enzimatică |

$mmol/l = mg/dl \times 1665 \times 10^{-4}$ $\quad mg/dl = mmol/l \times 6006 \times 10^{-3}$

$mmol/d = g/24\ h \times 1665 \times 10^{-2}$ $\quad g/24\ h = mmol/l \times 6006 \times 10^{-5}$

În clinică, creșterea nivelului uremiei peste valoarea de 40 mg/100 ml a primit denumirea improprie de **azotemie.**

După originea lor, azotemiile pot fi renale sau extrarenale.

În toate azotemiile extrarenale, creșterea nivelului uremiei se datorește incapacității rinichiului de a elimina un exces de uree rezultat printr-un proces de ureogeneză.

Pierderile de apă și săruri minerale determină creșterea nivelului uremiei prin deshidratarea compartimentelor celulare și prin hiperhidratarea celulară excesivă, reprezentând un dezechilibru hidroelectrolitic care determină azotemia prin lipsă de săruri minerale.

Nivelul uremiei servește la stabilirea coeficienților de eliminare în raport cu nivelul uremiei și cu diureza (clearance de uree).

Tabelul IV.3. **TIPURI DE AZOTEMII**

| Azotemii renale | Azotemii extrarenale |
|---|---|
| • calculoză renală;<br>• insuficiență renală acută sau cronică;<br>• nefrită acută și cronică;<br>• rinichi polichistic;<br>• tuberculoză renală. | ▪ datorate unei oligurii:<br>- insuficiență cardiacă;<br>- boli infecțioase acute;<br>▪ azotemii prin deficit de săruri minerale:<br>- boala lui Addison;<br>- diaree, vărsături;<br>▪ exacerbarea ureogenezei:<br>- diabet zaharat;<br>- hemoragii gastrointestinale;<br>- encefalite. |

Tabelul IV.4. **HIPERAZOTURII ȘI HIPOAZOTURII**

| Hiperazoturii | Hipoazoturii |
|---|---|
| ◆ catabolism intens al proteinelor tisulare:<br>- maladii febrile;<br>- administrare de tiroxină;<br>◆ intoxicații cu plumb sau mercur;<br>◆ tulburări endocrine:<br>- diabet zaharat;<br>- diabet azoturic. | ◆ afecțiuni hepatice:<br>- atrofia galbenă acută;<br>- ciroza atrofică;<br>- cancerul hepatic;<br>◆ afecțiuni renale:<br>- nefrite acute, cronice;<br>- nefrite mercuriale, saturniene;<br>◆ administrarea unor hormoni (STH, testosteron);<br>◆ acidoze. |

Eliminarea scăzută de uree (**hipoazoturie**) se datorește:

► micșorării capacității funcționale a ficatului care determină scăderea cantității de uree sintetizată;

► reabsorbției tubulare defectuoase în cazul afecțiunilor renale;

► anumiți hormoni (STH, testosteronul) scad excreția de uree, datorită intensificării biosintezei proteinelor;

► în acidoze, deoarece este necesară o cantitate mare de amoniac pentru a neutraliza corpii cetonici.

### *IV.2.3. METODE DE DOZARE A UREEI*

Dozarea ureei se face prin mai multe metode:

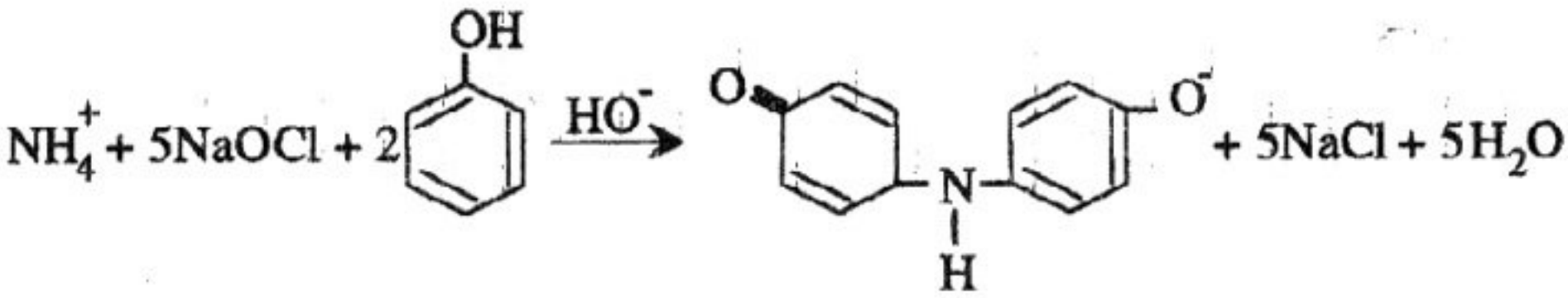
- ➢ metoda azotometrică (Kowarsky), mai puțin exactă;
- ➢ metoda colorimetrică cu diacetilmonoxima (Kitamwa-Juky);
- ➢ metoda enzimatică cu ureaza (Berthelot).

### *IV.2.3.1. METODA ENZIMATICĂ (BERTHELOT)*

**Principiul metodei.** Ureea este hidrolizată prin intermediul ureazei (ureo amino hidrolaza, E.C.3.5.1.5.), iar amoniacul format este dozat prin reacția Berthelot prin care ionul amoniu reacționează cu hipocloritul de sodiu și cu fenolul, în mediu alcalin, rezultând indofenolul, substanță colorată în albastru a cărei extincție, care este proporțională cu concentrația ionului amoniu, se citește la $\lambda = 620$ nm.

Nitroprusiatul se adaugă pentru a cataliza reacția:

$$\begin{matrix} H_2N \\ H_2N \end{matrix}\!\!>C=O + H_2O \xrightarrow{\text{UREAZĂ}} 2NH_3 + CO_2 \xrightarrow{H_2O} 2NH_4^+ + CO_3^{2-}$$



**Reactivi**

1) Fenol 150 mM-nitroprusiat de sodiu 0,47 mM. Soluția este stabilă la 4ºC timp de mai multe luni. Fiecare sticlă conține 250 ml reactiv.

2) Hipoclorit de sodiu 0,013 N în NaOH 0,13 N. Se păstrează la +4ºC timp de mai multe luni. Fiecare sticlă conține 250 ml reactiv.

3) Standard uree 6,67 mM (corespunde la 40 mg uree/100 ml).

4) Standard sulfat de amoniu 6,67 mM.

5) Urează. Fiecare flacon conține enzimă pentru 25-50 determinări. Înaintea unei serii de determinări se dizolvă conținutul unui flacon în 5 ml ser fiziologic. Se agită, suspensia rezultată fiind stabilă la +4ºC timp de cel puțin 2 săptămâni. Înaintea fiecărei determinări se agită conținutul flaconului.

**Tehnica de lucru**

Pentru fiecare serie se pregătesc 3 eprubete de hemoliză (martor, standard uree, standard de sulfat de amoniu) și un număr de eprubete egal cu numărul de probe de analizat.

| **Reactivi** | **Martor** | **Standard uree** | **Standard sulfat de amoniu** | **Probă** |
|---|---|---|---|---|
| Suspensie urează (5) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Standard uree (3) | - | 0,02 | - | - |
| Standard sulfat de amoniu (4) | - | - | 0,02 | - |
| Ser de analizat | - | - | - | 0,02 |
| Se agită și se incubează 30 de minute la temperatura camerei sau 15 minute la 37ºC după care se adaugă: | | | | |
| Reactiv fenolic (1) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Reactiv hipoclorit (2) | 5 | 5 | 5 | 5 |

Se agită energic și se lasă 30 de minute la temperatura camerei. Se citește extincția la $\lambda = 620$ nm față de martor.

**Calcul:** mg uree/100 = $\frac{E_P}{E_S} \times 40$ ,

40 = concentrația standard uree;

$E_p$ = extincția probei;

$E_s$ = extincția standardului de uree.

**Observații:**

◆ precizia metodei este dependentă de hidroliza completă a ureei. Deoarece sunt posibile unele inactivări accidentale ale ureazei, s-a introdus o probă suplimentară de verificare, standardul de sulfat de amoniu. În condiții normale, extincția celor două tipuri de standard trebuie să fie egală. Dacă ureaza este parțial inactivată, standardul de

uree va avea o extincție mai mică decât standardul de sulfat de amoniu. În acest caz se prepară urează proaspătă.

◆ pentru determinarea ureei urinare se procedează în mod similar cu deosebirea că urina se diluează de 100 de ori înainte de determinare.

$$\text{g uree/24 h} = \frac{E_P}{E_S} \times 40x \text{ volum urină (litri 24 h)}$$

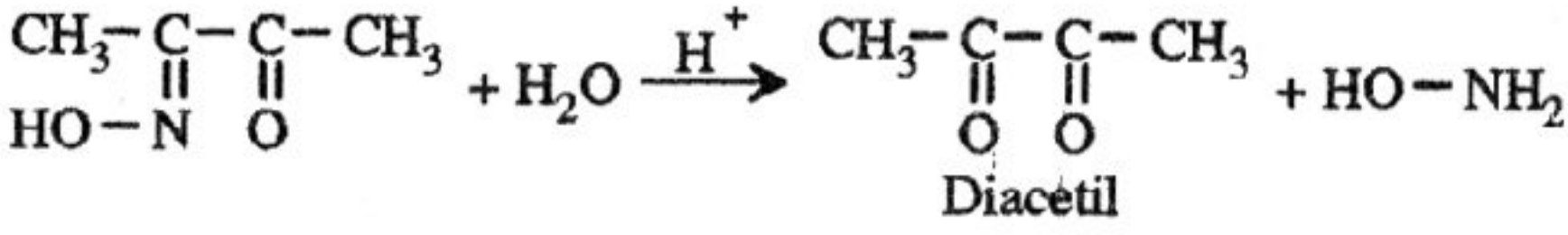
◆ peste valori ale ureei serice de 100 mg/100 ml, se diluează serul de 5 ori cu apă bidistilată (0,1 ml ser + 0,4 ml apă bidistilată) multiplicând rezultatul final cu 5.

◆ testul poate fi folosit pentru un număr dublu de determinări procedându-se astfel: se diluează serul de analizat și standardul de sulfat de amoniu de 10 ori cu ser fiziologic sau apă bidistilată, se pipetează 0,1 ml ser diluat (respectiv 0,1 ml din fiecare standard diluat), se incubează cu 0,1 ml suspensie urează ca mai sus, după care se adaugă fiecărei probe 2,5 ml reactiv (1) și 2,5 ml reactiv (2). Celelalte condiții, inclusiv calculul, rămân identice.

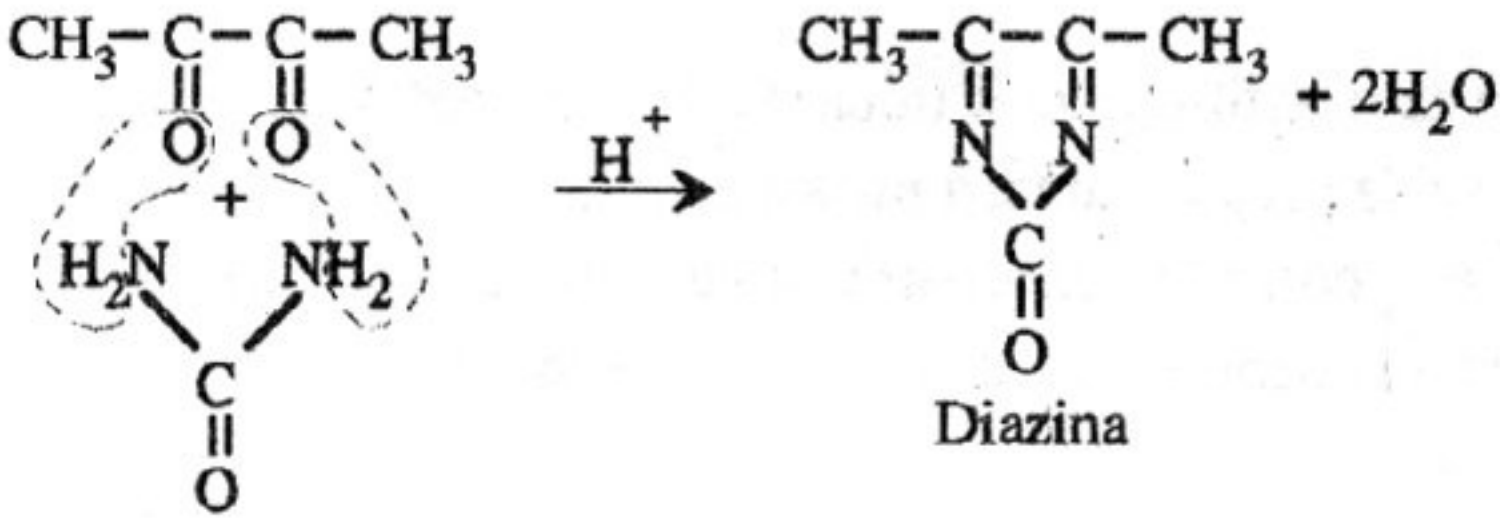
### *IV.2.3.2. DETERMINAREA UREEI CU DIACETIL MONOXIMĂ (KITAMWA-JUKY)*

**Principiul metodei**

Ureea se condensează cu diacetilul formând un compus colorat-diazina. Deoarece diacetilul este instabil, se utilizează diacetilmonoxima care, într-un mediu acid, generează diacetilul, conform reacției:




Diacetil



Diazina

Tiosemicarbazida și Fe (III) se adaugă pentru a intensifica culoarea.

**Reactivi**

- soluție de clorură de sodiu 0,9%;
- acid tricloracetic 10%;
- reactiv combinat: acid sulfuric 2 M, acid fosforic 2 M, clorură ferică 1,8 mM, tiosemicarbazidă 0,66 mM; se amestecă 54 ml acid sulfuric (d = 1,84) cu 57 ml acid fosforic (d = 1,71) și se toarnă cu precauție, răcind, în 350 ml apă. În acest amestec se dizolvă 243 mg clorură ferică $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ și 30 mg tiosemicarbazidă. Se aduce la 500 ml cu apă distilată. Se conservă în sticlă brună (o lună la temperatura camerei, până la 6 luni la frigider).
- diacetilmonoximă 59,5 mM: se dizolvă 0,6 g diacetilmonoximă în 100 ml acid acetic 5%. Se conservă până la 6 luni.
- standard: se dizolvă 50 mg uree în 100 ml soluție saturată de acid benzoic. Se conservă bine la frigider.

**Pregătirea materialului de analizat.** Se poate lucra pe probe de ser, plasmă sau sânge total. Pentru ser sau plasmă limpezi și nehemolitice, se poate lucra fără deproteinizare, numai cu diluție. Pentru sânge total sau lichide tulburi ori hemolizate este necesară deproteinizarea.

**Diluția.** Se introduc cu micropipeta 0,1 ml ser sau plasmă în 1 ml clorură de sodiu 0,9%. Pentru lichid cefalorahidian se iau probe de 0,9 ml, diluat în 1 ml clorură de sodiu 0,01%. Urina se diluează 1/500 introducând 0,1 ml urină centrifugată în 50 ml apă.

**Deproteinizarea.** Se introduc 0,1 ml sânge, ser sau plasmă în 0,5 ml apă și se adaugă amestecând 0,5 ml acid tricloracetic.

După 5 minute se centrifughează. Standardul se diluează cu clorură de sodiu 0,9% la fel ca serul, 1/10.

**Reacția de culoare.** În 3 eprubete, probă (P), standard (S), blanc (B), se pipetează reactivii. Se amestecă bine. Se ține 8 minute în baia de apă fierbinte. Se răcește în apă curentă. După 5 până la 20 de minute se măsoară extincția probelor (EP) și a standardului (ES) față de blancul (B) la 525 nm în cuvă de 1 cm.

| Reactivi (ml) | P | S | B |
|---|---|---|---|
| Diluție sau supernatant | 0,1 | - | - |
| Diluție standard | - | 0,1 | - |
| Apă distilată | - | - | 0,1 |
| Reactiv combinat | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Diacetil monoximă | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

**Calcul:** mg uree/100 ml ser, plasmă $= \frac{E_P}{E_S} \times 50$

Urina fiind diluată de 50 de ori față de standard:

$$\frac{E_P}{E_S} \times 2500 = \text{mg uree/100 ml urină}$$

$$\frac{E_P}{E_S} \times 25 = \text{mg uree/1000 ml urină}$$

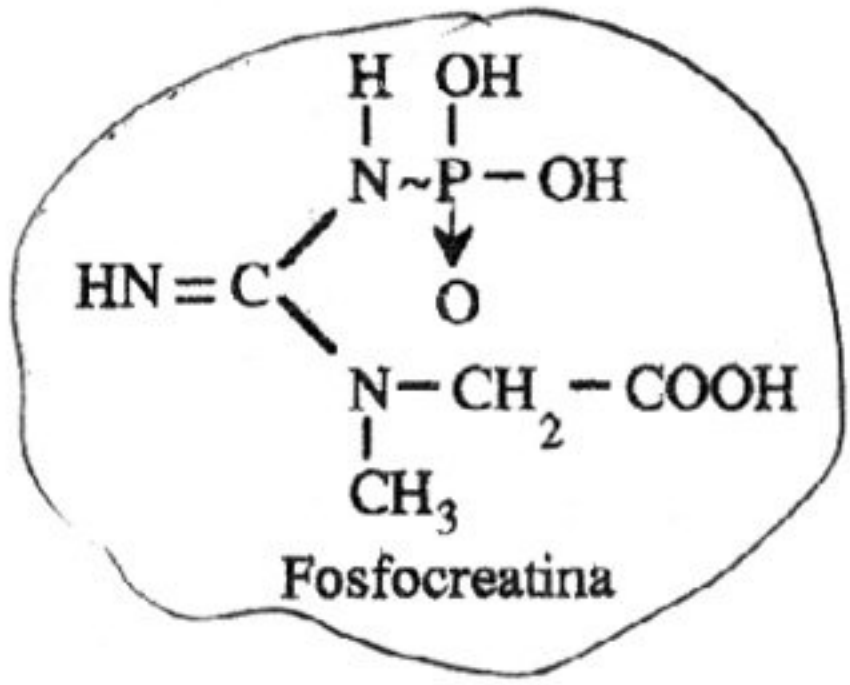
**Observații:**

- la copii se poate recolta 0,01 ml sânge din înțepătură la deget sau ureche, făcându-se imediat deproteinizarea;
- metoda permite determinări de urgență în 12-15 minute (recoltat sânge total, deproteinizat imediat, realizarea reacției de culoare și măsurarea imediată a extincției).

# IV.3. CREATINA ȘI CREATININA

## *IV.3.1. GENERALITĂȚI*

Creatina (acid metilguanidinacetic) este un compus sintetizat în **ficat, rinichi** și **pancreas** și, ulterior sintezei sale, transportat prin intermediul sângelui la nivelul **mușchilor** și **creierului.** La acest nivel, creatina se transformă în **fosfocreatină,** una din cele mai importante substanțe energogene, necesară procesului de contracție musculară și de obținere a energiei la nivelul creierului.



Fosfocreatina

La nivelul celulelor musculare și creierului, creatina sub formă de creatinfosfat își îndeplinește rolul de generator de energie și prin urmare este inexistent în lichidele biologice, determinarea sa cantitativă nu are valoare clinică.

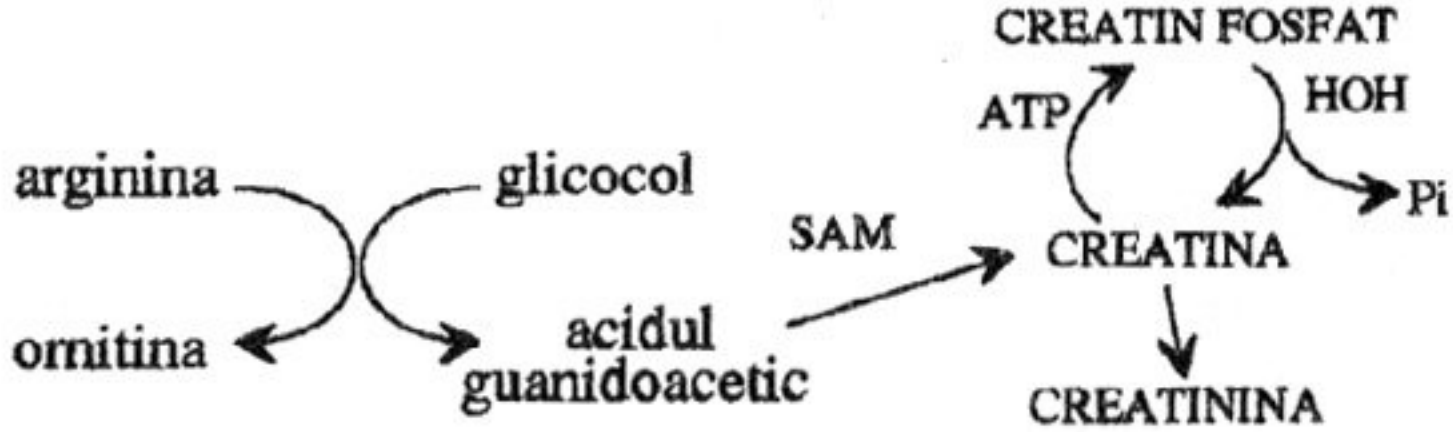
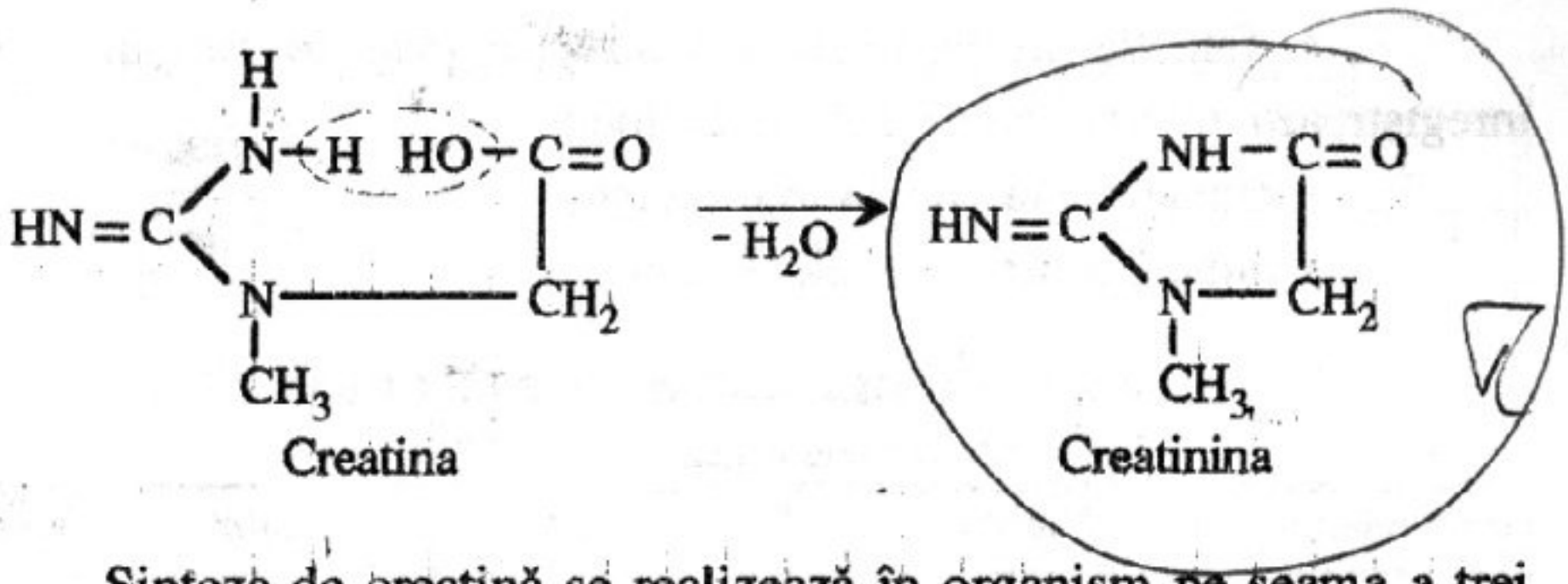


Fig.IV.4. **Schema metabolismului creatinei**

O mică fracțiune din fosfocreatină (constatată pentru aceeași masă musculară) pierde gruparea fosfat și formează creatina liberă. Creatina fiind deosebit de instabilă la pH-uri bazice sau acide se transformă în anhidrida sa, **creatinina,** care trece în sânge și apoi este eliminată pe cale renală.




Sinteza de creatină se realizează în organism pe seama a trei aminoacizi:

- **arginina,** donor al grupării **guanidice;**
- **glicocolul,** donor al restului **acetic;**
- **metionina,** ca donor al grupării **metil** sub formă de S-adenozilmetionina (SAM).

### *IV.3.2. IMPORTANȚA FIZIOPATOLOGICĂ. VALORI NORMALE*

Creatinina formată este direct proporțională cu masa musculară, reprezentând unul dintre cei mai obiectivi indici ai acesteia și implicit fiind mai mare la bărbați decât la femei.

Deoarece sinteza și eliminarea din țesuturi a creatininei sunt remarcabil de constante, fac din determinarea sa una din cele mai utile analize în aprecierea clearance-ului renal, metodă prin care se poate evalua în mod exact viteza de filtrare glomerulară și, deci, se poate stabili capacitatea funcțională a rinichilor.

Analizând tabelul de mai jos se constată următoarele:

- la copii, nivelul plasmatic al creatininei este mai crescut decât la adulți;
- la bărbați, nivelul plasmatic dar și urinar este superior celor de la femei, datorită masei musculare.

Excreția creatininei este un indicator al metabolismului muscular, fiind un component tipic al acestui țesut.

Se înregistrează un nivel crescut al creatininei serice și urinare în următoarele situații:

• femeile în perioada menstruației sau în timpul sarcinii înregistrează un nivel crescut al creatininei;

• după o dietă bogată în proteine;

• după eforturi musculare intense.

Tabelul IV.5. **VALORILE NORMALE ALE CREATININEI**

(după Radu Mihai Vasile, 1986)

| Proveniența | Vârsta | µmol/l | mg/dl | Metoda |
|---|---|---|---|---|
| ser, plasma | nou născut | 80-180 | 0,9-2,0 | Folin-Wu |
| | copil 5-6 zile | 60-120 | 0,7-1,4 | |
| | copil 1-6 ani | 80-150 | 0,9-1,7 | |
| | copil 6-16 ani | 106-203 | 1,2-2,3 | |
| | bărbați | 61,8-106 | 0,7-1,2 | |
| | femei | 53-97,5 | 0,6-1,1 | |
| LCR | adulți | 44,2-106 | 0,5-1,2 | |
| | | mmol/kg corp/dl | mg/kg corp/24 h | |
| Urină | nou născut prematur 1-2 săptămâni | 0,055-0,176 | 8,3-19,9 | Folin-Wu |
| | copil cu lapte de vacă | 0,09-0,13 | 10-15 | |
| | copil o lună cu lapte de mamă | 0,05-0,19 | 6-21 | |
| | copil 6 luni | 0,05-0,19 | 6-21 | |
| | copil 6 ani | 0,06-0,19 | 8,7-24,5 | |
| | bărbați | 0,08-0,22 | 8,7-24,5 | |
| | femei | 0,06-0,19 | 7,3-21,4 | |

$\mu mol/l = mg/dl \times 884 \times 10^{-1}$

$mg/dl = \mu mol/l \times 1131 \times 10^{-5}$

$mmol/kg/d = mg/kg/24\ h \times 884 \times 10^{-5}$

$mg/kg/24\ h = mmol/kg/d \times 11312 \times 10^{-2}$

Creșterea nivelului creatininei în sânge și eliminarea crescută a acestui compus prin urină implică următoarele mecanisme:

➢ creșterea producției de creatină;

➢ distrugerea celulelor musculare;

➢ o disproporție între producția de creatină în ficat și masa musculară diminuată, care nu mai poate capta creatina produsă.

Variațiile patologice ale creatininei sunt rezumate în tabelul IV.6.

Tabelul IV.6. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE CREATININEI**

| **Hipercreatininemii** | **Hipercreatininurii** |
|---|---|
| ◆ Afecțiuni renale:<br>- insuficiență renală;<br>- nefrite cronice.<br>◆ Afecțiuni musculare:<br>- distrofii musculare;<br>- eclampsie.<br>◆ Afecțiuni endocrine:<br>- acromegalie;<br>- diabet zaharat. | ◆ Afecțiuni musculare:<br>- atrofie musculară;<br>- amiotonie congenitală;<br>- distrofii musculare;<br>- miastenia gravis.<br>◆ Afecțiuni endocrine:<br>- acromegalie; - boala lui Addison;<br>- diabet zaharat; - hipotiroidism.<br>◆ Afecțiuni diverse:<br>- febră; - pneumonie; - tifos;<br>- poliomielită. |

În tabelul IV.7. se evidențiază dependența dintre masa corporală și creatininurie.

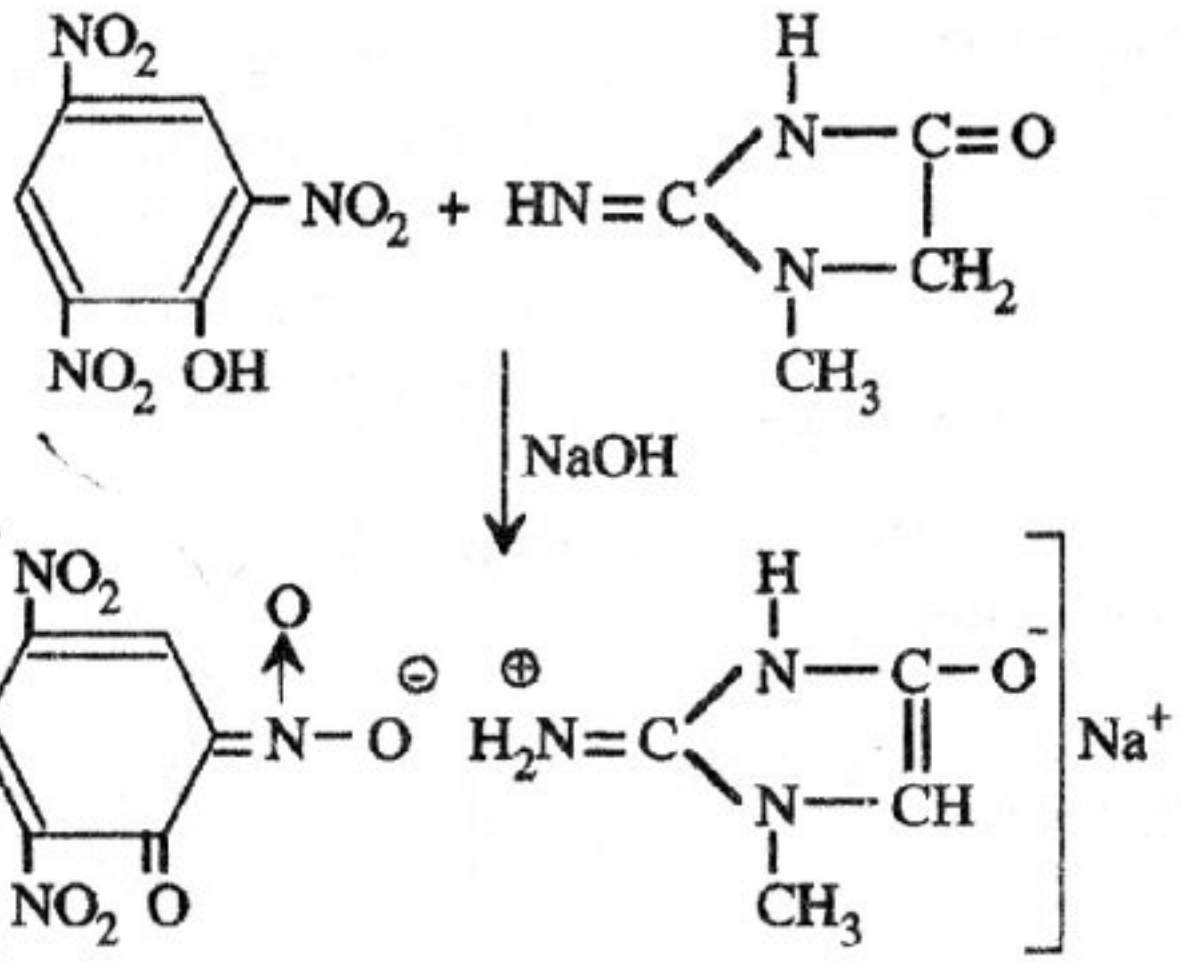
Tabelul IV.7. **CREATININURIA ȘI MASA ORGANISMULUI**

| **Talia cm** | **Masa kg** | **Creatininurie de 24 h mmol** |
|---|---|---|
| 157,5 | 56 | 11,0 |
| 160,0 | 57,6 | 11,7 |
| 162,5 | 59 | 12,0 |
| 165,5 | 60,3 | 12,3 |
| 167,6 | 62,0 | 12,6 |
| 170,2 | 63,8 | 13,0 |
| 172,7 | 65,8 | 13,3 |
| 175,3 | 67,6 | 13,7 |
| 177,8 | 69,4 | 14,1 |
| 180,3 | 71,4 | 14,5 |
| 182,9 | 73,5 | 15,0 |
| 185,4 | 75,6 | 15,4 |
| 188,0 | 77,6 | 15,7 |
| 190,5 | 79,6 | 16,2 |
| 193,0 | 82,2 | 16,7 |

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
BIBLIOTECA nr. 1 PRECLINIC
Nr. de inventar: 1652
Cotă: ..... II 74.469

**Principiul metodei.**

Creatinina din ser, plasmă deproteinizată sau urină centrifugată reacționează cu acidul picric, în mediu alcalin, formându-se un complex colorat a cărui intensitate este fotometrată la 530 nm (reacția Jaffé).




**Reactivi**

- acid picric, soluție saturată: se dizolvă aproximativ 4 g acid picric în 250 ml apă, încălzind pe o baie de apă. Se lasă să se răcească. Se decantează soluția supernatantă;
- hidroxid de sodiu, soluție 10%;
- standard stoc: se dizolvă 100 mg creatinină în 100 ml HCl 0,1n. Se conservă în frigider 6 luni. Standard de lucru: se diluează 1 ml standard stoc la 100 ml cu apă. Conține 1 mg creatinină/100 ml. Se conservă 2 săptămâni la frigider.

**Materialul de analizat.** Se folosește ser limpede și mai ales nehemolizat, deoarece eritrocitele conțin substanțe care interferează în reacția Jaffé. Urina centrifugată se diluează 1/100 cu apă.

**Deproteinizare.** Se pipetează în eprubete de centrifugă 1 ml ser (sau urină diluată) în 3 ml acid picric amestecând continuu. Se

centrifughează 5 minute la 3000 rot/min. Se pipetează 1 ml standard de lucru în 3 ml acid picric.

**Reacția de culoare.** În 3 eprubete se pipetează probele (P), un standard (S) și un blanc (B).

| Reactivi | P | S | B |
|---|---|---|---|
| Supernatant | 2,00 | - | - |
| Standard + Acid picric | - | 2,00 | - |
| Acid picric | - | - | 1,5 |
| Hidroxid de sodiu | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Apă distilată | - | - | 0,5 |

Se amestecă și după 20 de minute se măsoară extincțiile probelor (EP) și standardului (ES), față de blancul (B) la 530 nm, în cuvă de 1 cm.

Calculul: mg creatinină/100 ml ser = $\frac{E_P}{E_S}$

Urina fiind diluată 1/100: g creatinină/l urină = $\frac{E_P}{E_S}$

**Observații.** Reacția Jaffé nu este strict specifică pentru creatinină, însă în prezent este intens folosită, rezultatele fiind satisfăcătoare pentru uzul clinic; recent s-au introdus tehnici enzimatice, de mare exactitate.

## IV.4. ACIDUL URIC

### *IV.4.1. GENERALITĂȚI*

În contextul general al catabolismului proteic, acidul uric reprezintă metabolitul principal al purinnucleozidelor și, implicit, al acizilor nucleici.

Acidul uric este la om termenul final al catabolismului bazelor purinice rezultat prin multiple procese de oxidare enzimatică la nivelul ficatului (vezi figura IV.5.).

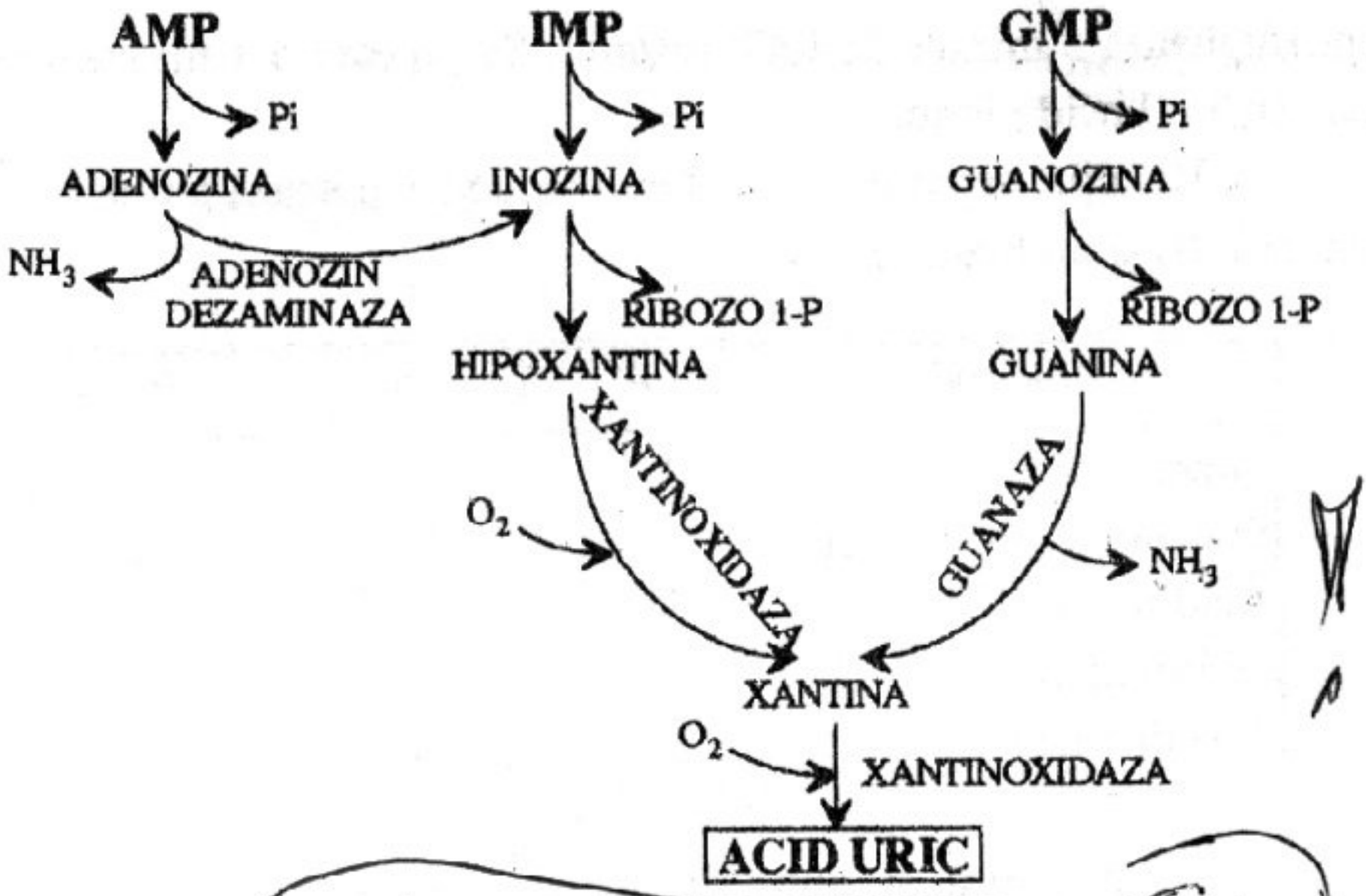



Fig.IV.5. **Schema de degradare a derivaților purinici**

Deși la om termenul final al degradării bazelor purinice este acidul uric, totuși în mod normal circa 15-25% din acidul uric produs este eliminat din ficat în tractul intestinal unde este degradat de bacterii care conțin uricază până la alantoină, uree și $CO_2$.

Relația existentă între purinele de diverse origini din organism și acidul uric este prezentată în figura IV.6.

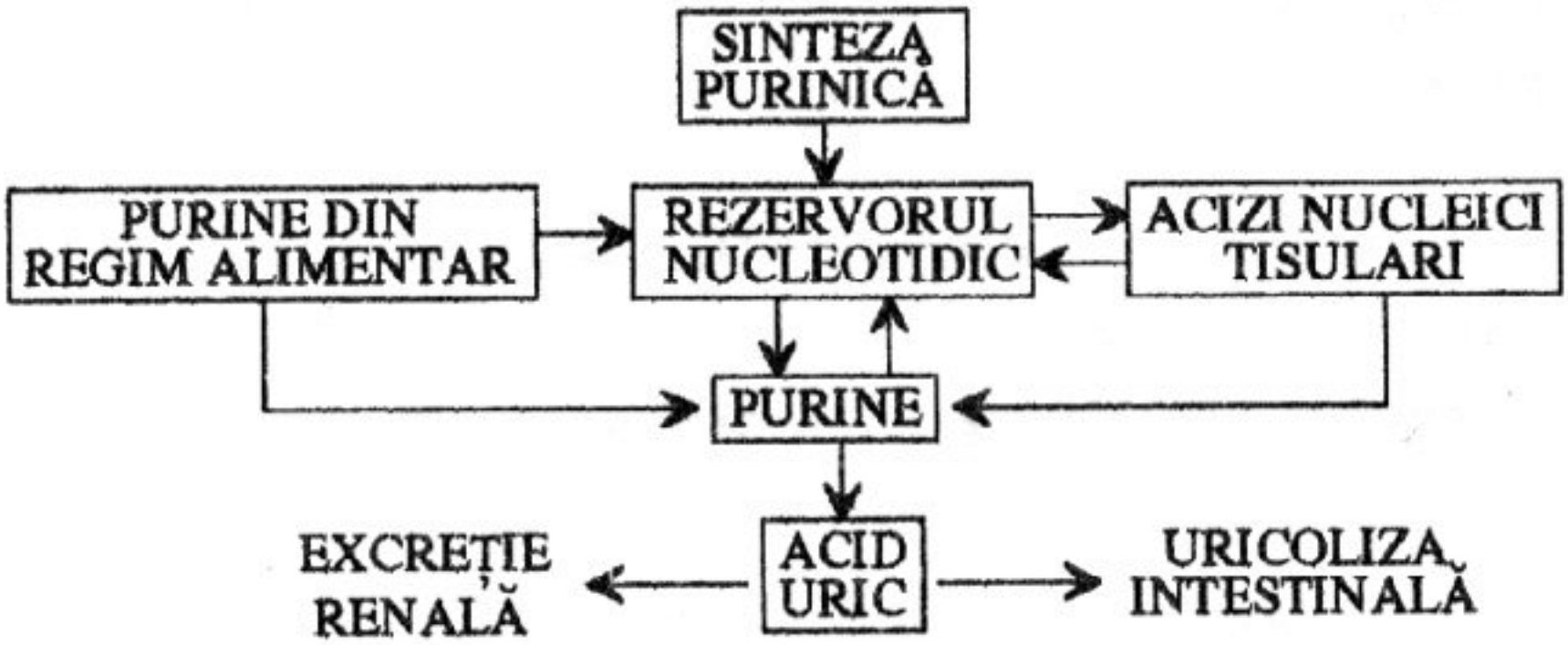
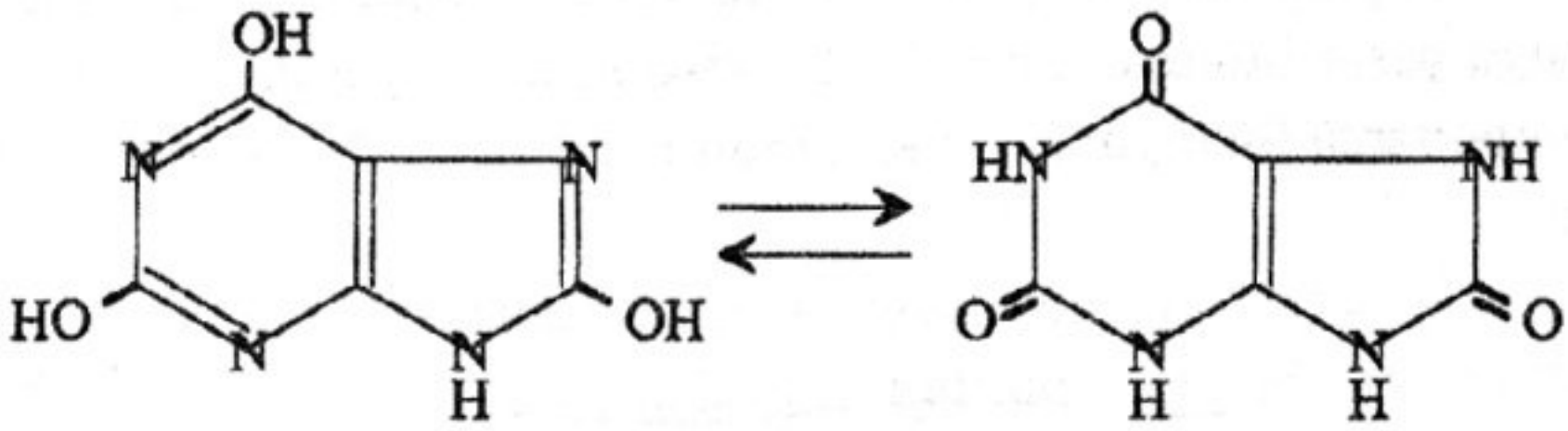



Fig.IV.6. **Originea și soarta purinelor din organism**

Eliminarea acidului uric se face în special pe cale renală prin procese de filtrare, reabsorbție și, mai ales, secreție tubulară, menținând nivelul sanguin al acidului uric în limitele de siguranță.

În sânge, acidul uric se găsește sub forma sa enolică ai cărei atomi de hidrogen au proprietăți acide; la pH-ul fiziologic, unul singur din acești hidrogeni, cel de la $C_2$ se comportă ca o grupă acidă.




În sânge, 99% din acidul uric se găsește sub formă de urat monosodic, care are o solubilitate mai mare decât acidul uric liber.

### *IV.4.2. VALORI NORMALE. VARIAȚII FIZIOPATOLOGICE*

Valorile acidului seric (uricemia) și urinar (uricuria) variază în funcție de o serie de factori ca: alimentație, sex, vârstă, factori genetici, stări patologice.

Tabelul IV.8. **VALORILE NORMALE ALE ACIDULUI URIC**
(după Radu Mihai Vasile)

| **Proveniența** | **Vârsta** | **µmol/l** | **mg/dl** | **Metoda** |
|---|---|---|---|---|
| ser, plasma | nou născuți | 240-360 | 4,0-6,0 | Folin-Denis |
| | copii 12 ani | 140-320 | 2,3-5,3 | |
| | bărbați | 240-420 | 4,0-7,0 | |
| | femei | 180-360 | 3,0-6,0 | |
| LCR | copii | 18-89 | 0,3-1,5 | |
| | adulți | 18-119 | 0,3-2,0 | |
| | | mmol/d | mg/24 h | |
| Urină | adulți | 1,48-4,46 | 250-750 | Folin-Denis |
| | alimentație săracă în purine | - 11,9 | - 2000 | |
| | alimentație bogată în purine | | | |

$\mu mol/l = mg/dl \times 884 \times 10^{-1}$; $mg/dl = \mu mol/l \times 1131 \times 10^{-5}$

$mmol/kg/d = mg/kg/24\ h \times 884 \times 10^{-5}$;

$mg/kg/24\ h = mmol/kg/d \times 11312 \times 10^{-2}$

La indivizii sănătoși, sinteza diurnă de acid uric este de aproximativ 400 mg, iar cea provenită din sursele alimentare (carne, icre, creier) este de circa 300 mg.

Hiperuricemia reprezintă creșterea concentrației acidului uric în sânge peste limitele normale. Ea însoțește o serie de afecțiuni, cea mai importantă fiind guta care este mult mai frecventă la bărbați decât la femei.

În raport cu mecanismele care pot determina formarea în exces a acidului uric, hiperuricemiile se clasifică astfel:

- hiperuricemii primare sau idiopatice;
- hiperuricemii secundare.

Tabelul IV.9. **MECANISMELE CARE DETERMINĂ HIPERURICEMIILE**

| **Hiperuricemii primare** | **Hiperuricemii secundare** |
|---|---|
| ▪ aport excesiv alimentar;<br>▪ exagerarea procesului sintezei de novo a purinelor;<br>▪ eliminarea renală și intestinală insuficientă a acidului uric;<br>▪ distrugerea insuficientă a acidului uric în organism. | ▪ nu au la bază un factor determinat genetic;<br>▪ sunt secundare unei alte afecțiuni sau anumitor terapii;<br>▪ dispar odată cu suprimarea cauzei, vindecarea bolii sau întreruperea unei terapii;<br>▪ uricemia inițială este normală. |

În tabelul IV.10. sunt prezentate principalele afecțiuni manifestate cu hiperproducție de acid uric.

Administrarea unor medicamente determină manifestări de hiperuricemie secundară: aspirina, diuretice, adrenalina, noradrenalina.

**Hipouricemiile.**

Scăderea uricemiei sub limita inferioară a valorilor normale (2,5 mg/100 ml) este mult mai rar întâlnită decât hiperuricemiile.

Hipouricemia poate surveni atât în boli ale unor organe, în urma administrării unor medicamente sau poate fi consecința unor defecte enzimatice generale sau renale:

- ► xantinurii; ► diabetul azoturic; ► boala lui Wilson;
- ► intoxicații cu plumb;
- ► administrarea unor medicamente uricozurice.

Tabelul IV.10. **HIPERURICEMII**

| Tipul de afecțiune | Organul sau țesutul afectat | Afecțiuni |
|---|---|---|
| ◆ Tulburări endocrine | • paratiroidă;<br>• tiroidă;<br>• pancreas; | ▪ hiperparatiroidism;<br>▪ insuficiență tiroidiană;<br>▪ diabet zaharat; |
| ◆ Afecțiuni hepatice | • ficat; | ▪ intoxicații cu Pb sau Hg;<br>▪ alcoolism; |
| ◆ Boli genetice | | ▪ boala lui von Gierke;<br>▪ mongolism; |
| ◆ Boli ale sângelui | • organe hemato-formatoare; | ▪ leucemii acute;<br>▪ leucemii cronice;<br>▪ hemopatie;<br>▪ boala lui Hodgkin;<br>▪ anemie;<br>▪ mielomul multiplu; |
| ◆ Afecțiuni renale | • rinichi; | ▪ glomerulonefrită cronică;<br>▪ nefropatie;<br>▪ scleroză renală; |
| ◆ Boli cardiovasculare | • inimă;<br>• vase de sânge; | ▪ insuficiență cardiacă;<br>▪ HTA;<br>▪ ateroscleroză; |
| ◆ Distrugeri ale țesuturilor | • pielea; | ▪ arsuri întinse;<br>▪ radioterapie; |
| ◆ Hiperuricemii primare | • rinichi. | ▪ gută;<br>▪ nefropatie metabolică;<br>▪ litiază urică. |

**Hiperuricurii** fiziologice se înregistrează după ingerarea unor alimente bogate în acizi nucleici (creier, ficat, mușchi, rinichi).

Hiperuricuriile înregistrate în stări patologice sunt consemnate în tabelul de mai jos.

Tabelul IV.11. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE URICURIEI**

| Hiperuricurii | Hipouricurii |
|---|---|
| ◆ Gută primară metabolică;<br>◆ Stări în care se degradează cantități mari de nucleoproteine:<br>- arsuri;<br>- iradieri cu raze X;<br>- radioterapie;<br>◆ Boli ale sângelui:<br>- leucemii;<br>◆ Diverse:<br>- boala lui Wilson;<br>- policitemia vera. | ◆ Înainte de crizele se gută;<br>◆ Afecțiuni renale:<br>- scleroză renală;<br>- nefrite. |

### *IV.4.3. METODE DE DOZARE A ACIDULUI URIC*

Cele mai utilizate metode se împart în 2 grupe:

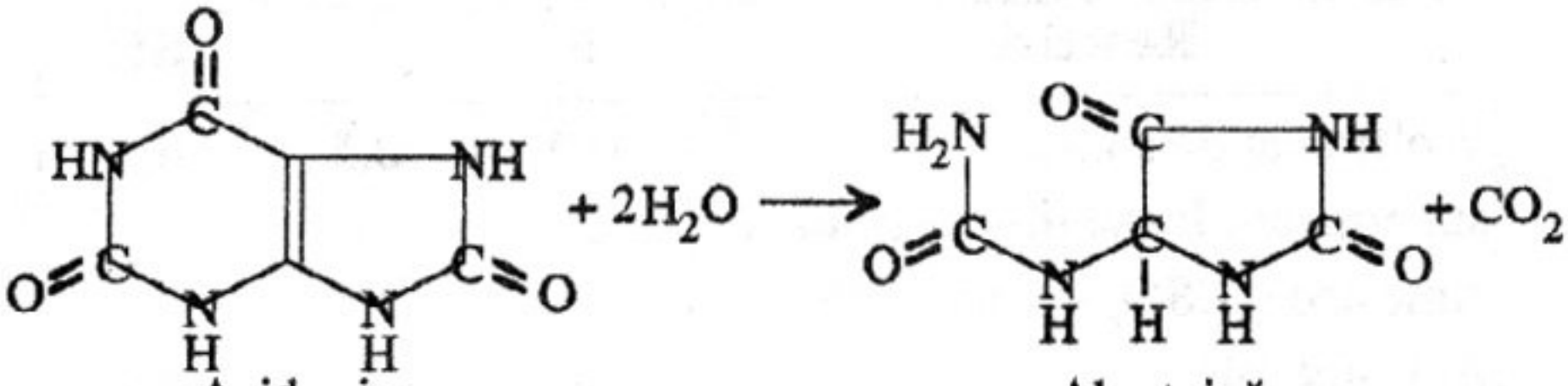
- **metode chimice** care utilizează ca reactiv acidul fosfotungstic;
- **metode enzimatice** cu uricază care are la bază oxidarea unui cromogen de către $H_2O_2$.

#### *IV.4.3.1. METODA FOLIN-DENIS*

**Principiul metodei.** Acidul uric prezent în serul sanguin și în urină reduce, în mediu alcalin, reactivul fosfo-wolframic la **albastru de wolfram**, a cărui intensitate este proporțională cu concentrația acidului uric în proba de analizat.

$$12Na_2WO_4 + 9H_3PO_4 \rightarrow P(W_2O_7)_6H_7 + 8Na_3PO_4 + 10H_2O$$

La rândul său, acidul uric se oxidează complet la alantoină și dioxid de carbon.




**Reactivi:**

- acid sulfuric 1 n; ▪ wolframat de sodiu dihidrat;
- reactiv fosfo-wolframic; ▪ soluție tampon pH = 12,5;
- soluție standard stoc. Conține 1 mg acid uric/ml.

**Pregătirea reactivilor de lucru:**

• se diluează cu apă distilată, în proporție 1:11;

• se dizolvă în apă distilată la volum de 30 ml, în cazul trusei pentru 50 de determinări și, respectiv, la volum de 60 ml, în cazul trusei pentru 100 de determinări.

Soluția se păstrează la frigider.

• 5,5 ml standard stoc se aduc la volum de 100 ml (balon cotat) cu apă distilată. Standardul de lucru astfel obținut conține 5 mg acid uric/100 ml.

Se păstrează la frigider.

**Material de analizat:**

Se folosesc seruri nehemolizate, proaspete sau conservate într-un vas cu 10 ml de NaOH 5% (pentru împiedicarea precipitării uraților); în vederea lucrului se diluează 1/100 cu apă.

**Tehnica de lucru:**

Se pipetează probele P în eprubete de centrifugă, un standard (S), pentru fiecare serie de probe și un blanc (BR), conform schemei:

| Reactivi | P | S | BR |
|---|---|---|---|
| Acid sulfuric de lucru | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Ser | 0,5 | - | - |
| Apă distilată | - | - | 0,5 |
| Standard de lucru | - | 0,5 | - |

Se omogenizează bine.

| Reactivi | P | S | BR |
|---|---|---|---|
| Wolframat de sodiu | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| supernatant P sau diluție urinară | 2,5 | - | - |
| Amestec ($H_2SO_4$ + standard) | - | 2,5 | - |
| Amestec BR | - | - | 2,5 |
| Soluție tampon | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Se omogenizează.<br>Se lasă 1 minut în repaus. | | | |
| Reactiv fosfo-wolframic | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

Se omogenizează energic. Se lasă 15 minute în repaus.

Între 15-30 de minute se măsoară extincțiile probelor (EP), extincția standardului de lucru (ES) și extincția blancului de reactivi (EBR) față de apă distilată la $\lambda = 710$ nm, în cuvă de 1 cm.

**Calcul:**

$\frac{EP-EBR}{ES-EBR} \times 5 =$ mg acid uric/100 ml ser.

În cazul când EP și ES se citesc față de BR, atunci calculul se face după formula:

$\frac{EP}{ES} \times 5 =$ mg acid uric/100 ml ser.

$\frac{EP}{ES} \times 0,5 =$ g acid uric/100 ml ser.

**Observații:**

Posibilele interferențe date de cantități moderate de glutation, glucoză, tirozină, ergotioneină, triptofan, cofeină, teofilină, salicilați etc., produse de aceste substanțe ca atare sau de metaboliții lor sunt nesemnificative; compușii sulfhidrici sunt eliminați datorită conservantului adăugat soluției tampon, iar acidul ascorbic se elimină ca posibilă interferență deoarece se oxidează la alcalinizare.

# IV.5. BILIRUBINA

## *IV.5.1. METABOLISMUL BILIRUBINEI*

Hemoglobina, cărăușul oxigenului de la plămâni spre cele mai îndepărtate celule ale organismului, este integrată într-o celulă specializată în transportul și menținerea sa în condiții optime - **hematia,** prin intermediul căreia circulă prin sânge.

Hemoglobina este o heteroproteină alcătuită din trei componente chimic distincte și anume:

- **fierul $Fe^{2+}$** care în combinație cu **protoporfirina IX** formează **hemul;**
- o parte proteică, **globina.**

Aminoacizii din care este alcătuită globina pot fi reutilizați pentru **"reconstrucții"** ulterioare ale hemoglobinei.

Fierul poate fi de asemenea reutilizat, în timp ce protoporfirina IX are un sens de degradare ireversibil, având ca rezultat **bilirubina,** care trebuie eliminată zilnic din organism într-o cantitate apreciabilă.

Pe plan chimic, fenomenul esențial al formării bilirubinei constă în deschiderea nucleului tetrapirolic porfirinic și transformarea lui într-un lanț deschis, liniar, cu fixarea a câte un atom de oxigen la cele două heterocicluri pirolice exterioare.

Catabolizarea hemoglobinei are un ritm alert datorită faptului că celula transportoare, **hematia,** are o durată medie de viață de numai 120 zile.

Pe oră sunt distruse aproximativ $1,5 \cdot 10^8$ hematii și astfel în 24 de ore sunt catabolizate 6-7 g hemoglobină.

Acest lucru se datorează faptului că într-o singură hematie sunt integrate aproximativ $250 \cdot 10^6$ molecule de hemoglobină. Apreciindu-se faptul că dintr-un gram de hemoglobină se formează circa 3,5 mg bilirubină zilnic, se vor forma, deci, în medie 250 mg bilirubină.

**Bilirubina** care se formează inițial, denumită **liberă** sau **indirectă,** este **liposolubilă** și, de aceea, poate pătrunde cu ușurință prin

membranele celulare (ceea ce în cazul unor concentrații ridicate poate produce leziuni severe în celulele SNC) evidențiind prin aceasta caracterul toxic al acesteia.

Efectul nociv al bilirubinei libere este contracarat în organism prin fixarea bilirubinei pe albumina serică, precum și formarea la nivelul ficatului de glucuronoconjugați ai bilirubinei care devine astfel hidrosolubilă și netoxică.

Bilirubina pătrunsă în plasmă se leagă în mod reversibil de albumina serică prin legături covalente, capacitatea maximă fiind de 2 moli de bilirubină pentru un mol de albumină.

Datorită caracterului discontinuu al capilarelor sinusoidale, complexul **albumină-bilirubină** ajunge în contact nemijlocit cu hepatocitele, astfel încât aceste celule pot prelua bilirubina. În procesul de preluare, bilirubina se desface de albumină și se conjugă cu acidul glucuronic formând mono și diglucuronidul.

Van der Bergh, în 1916, utilizând reactivul diazo (acid sulfanilic diazotat, descris de Ehrlich încă din 1883) pentru dozarea bilirubinei, a putut diferenția bilirubina în două forme **directă** și **indirectă**, constatând că alcoolul accelerează reacția de diazotare a bilirubinei libere neconjugate:

- **bilirubina directă** este fracțiunea care reacționează cu reactivul diazo imediat, în lipsa alcoolului;
- **bilirubina indirectă** este fracțiunea care reacționează întârziat cu reactivul diazo și în prezența alcoolului.

Variația cantitativă a formelor de bilirubină, a intermediarilor și catabolismului lor are o importanță diagnostică deosebită pentru chimia clinică.

Hematia ajunsă la limita de viață, aproximativ **120 de zile** este captată printr-un proces selectiv de către sistemul macrofagic din splină, măduvă osoasă și ficat și lizată cu eliberarea hemoglobinei care spontan, prin oxidarea fierului, se transformă în methemoglobină ($Fe^{+++}$).

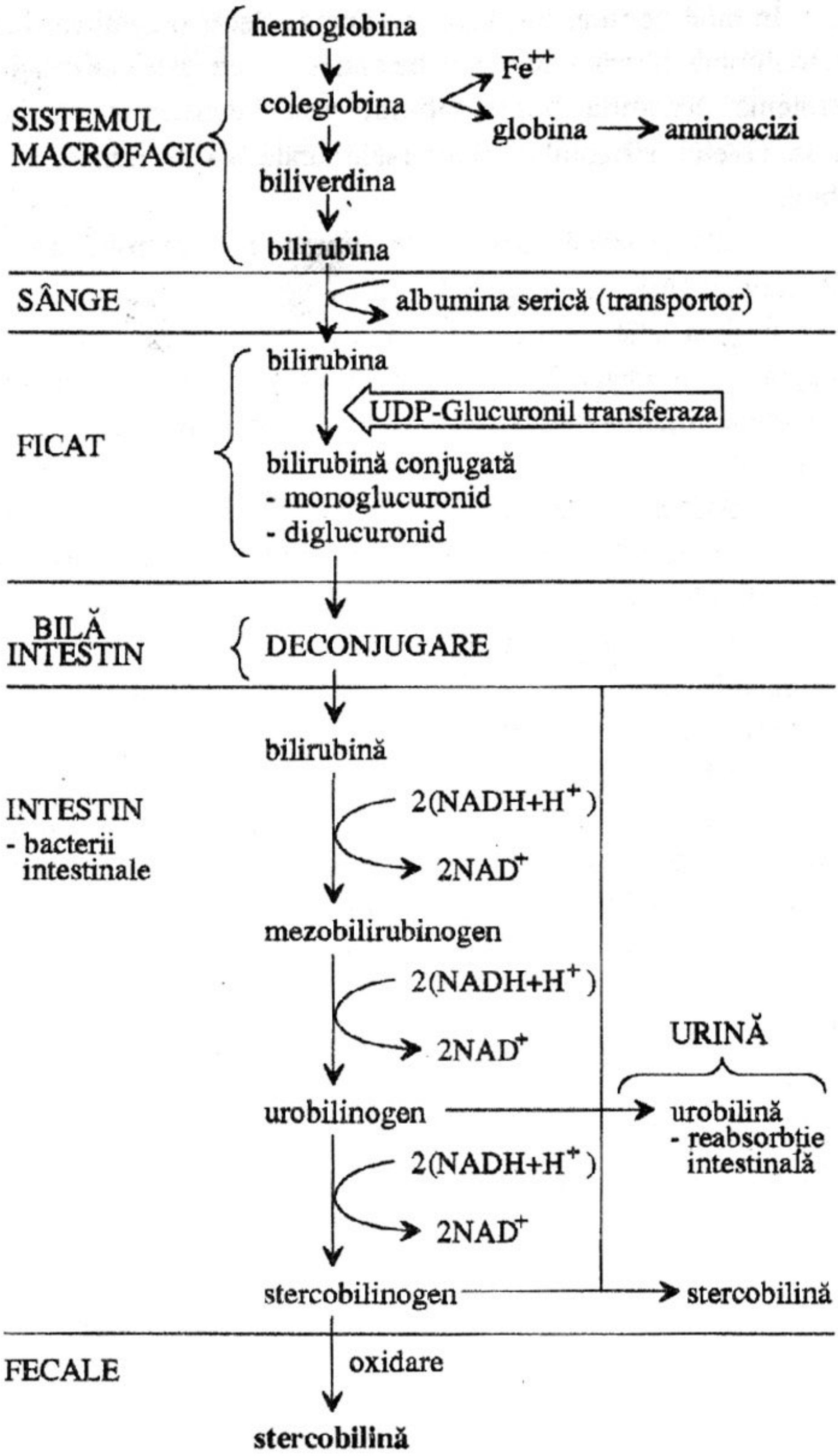



Fig. IV.7. **Catabolismul hemoglobinei**

În mod normal, în sânge, nu ajunge decât o cantitate limitată de hemoglobină liberă - în afara hematiei - care este ancorată de o glicoproteină denumită **haptoglobina,** prin intermediul căreia este adusă la nivelul sistemului macrofagic unde va fi transformată în bilirubină.

O altă proteină serică - **hemopexina** - are rolul de a face același lucru cu gruparea prostetică hem.

În ficat, atât hemoglobina cât și componentele derivate din ea sunt degradate oxidativ la nivelul microzomilor trecându-se printr-o serie de etape intermediare și care au ca termen final bilirubina (vezi figura IV.8.).

Aceste etape catabolice au loc cu participarea unui sistem oxidativ specializat în procese redox și unde un rol decisiv îl are citocromul P-450.

În cursul acestor faze de degradare se eliberează atât CO care se elimină prin respirație, cât și $Fe^{3+}$, ce este reutilizat în reformarea compușilor cu fier, prin captarea și depozitarea sa realizată de o proteină specifică, **feritina.**

Bilirubina, care se formează la nivelul SRE, este îndepărtată prin trecerea sa în sânge unde, dat fiind faptul că este greu solubilă în apă, se va lega de albumină la unul din cele două resturi propionil, formând un complex bilirubină-albumină, solubil în apă, bilirubina delta (bilirubina δ).

În acest mod, bilirubina va fi transportată la ficat care o va capta în totalitate, o va desface de albumină și prin intermediul a două proteine citosolice, **y** (ligandina) și **z** va fi condusă la microzomi unde acționează o enzimă denumită bilirubin-UDP-glucuronil-transferaza.

Pentru a înțelege eficiența acestui proces de transport al bilirubinei, vom preciza faptul că, în mod normal, în sânge nu se găsește decât o cantitate de maximum 1 mg bilirubină/100 ml sânge din cele 250 mg care se formează zilnic.

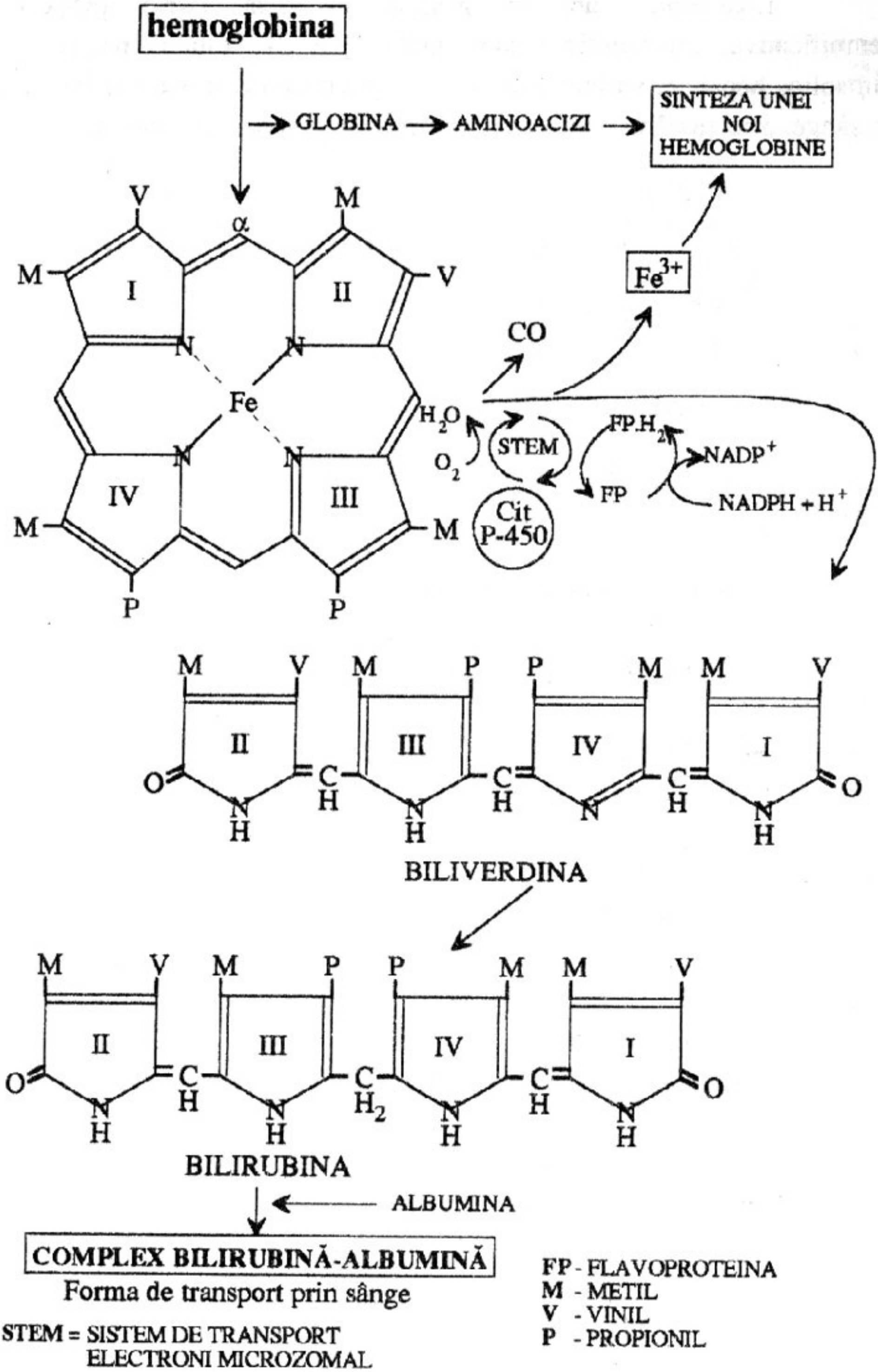



Fig.IV.8. **Catabolismul hemoglobinei**

Ligandina, care se găsește în ficat într-o proporție semnificativă, reprezentând aproximativ 5% din totalul proteinelor citosolice hepatice, va lega bilirubina împiedicând-o să se mai întoarcă în sânge, direcționând eliminarea sa prin bilă și apoi prin intestin.

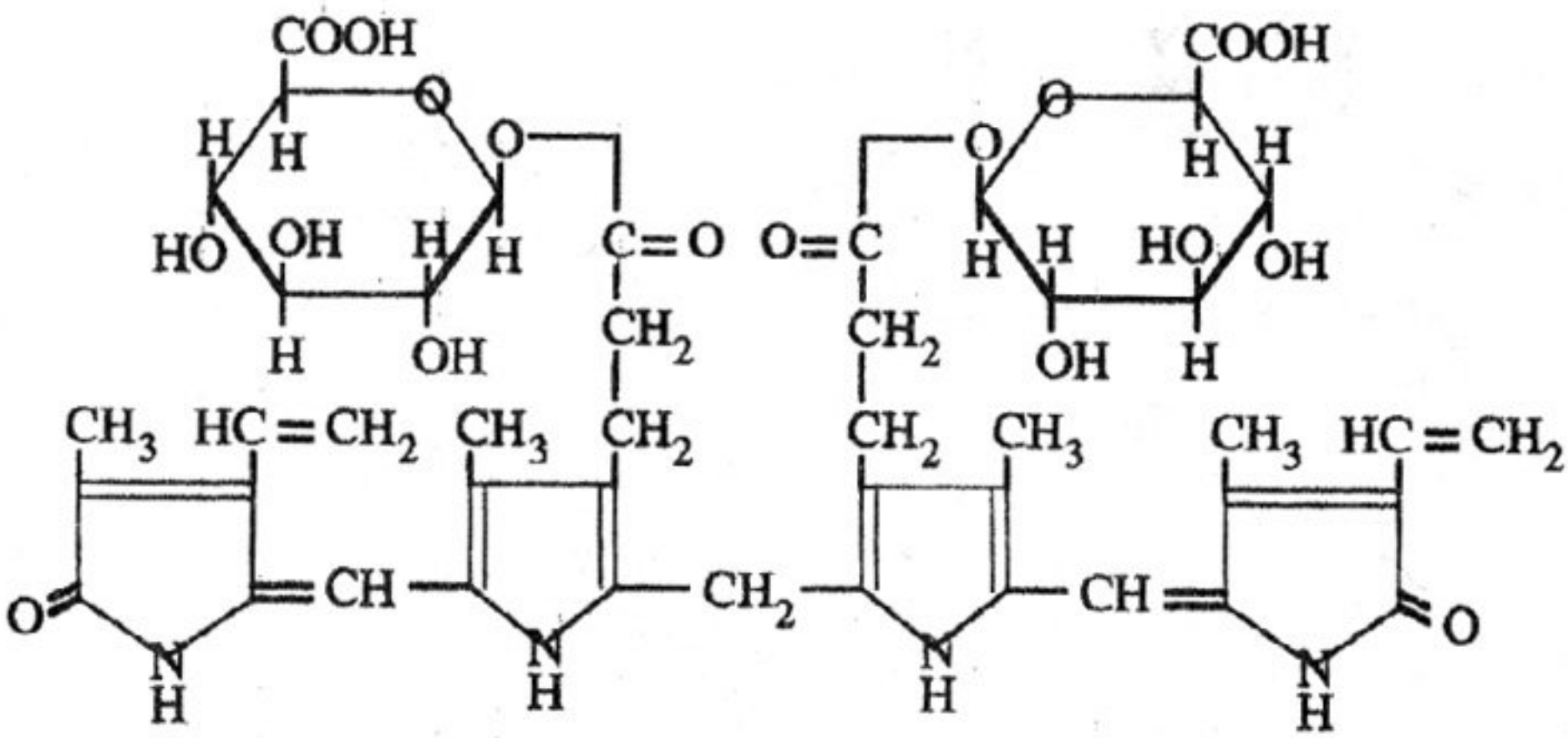



Fig.IV.9. **Structura diglucuronid-bilirubinei**

În hepatocit, la nivelul microzomilor, sub acțiunea enzimei UDP-glucuronil transferaza se formează într-o primă etapă bilirubin monoglucuronidul (β) și, ulterior, bilirubin diglucuronidul (γ).

Glucuronoconjugarea are loc la nivelul radicalului propionil, iar procentul de formare este de 90% pentru diglucuronid (γ) și 10% monoglucuronid (β).

Sub această formă glucuronoconjugată, bilirubina este excretată în bilă și de aici în intestin unde, sub acțiunea enzimelor din flora intestinală (β-glucuronidază), se produce deconjugarea cu eliberarea bilirubinei libere.

La nivelul intestinului, flora bacteriană realizează și reducerea acesteia, transformând-o în trei compuși necolorați: mezobilirubinogen, urobilinogen, stercobilinogen (vezi schema IV.7.). Acești pigmenți biliari se diferențiază prin gradul de hidrogenare al:

- radicalilor vinil;
- punților metinice;
- ciclurilor pirolice externe.

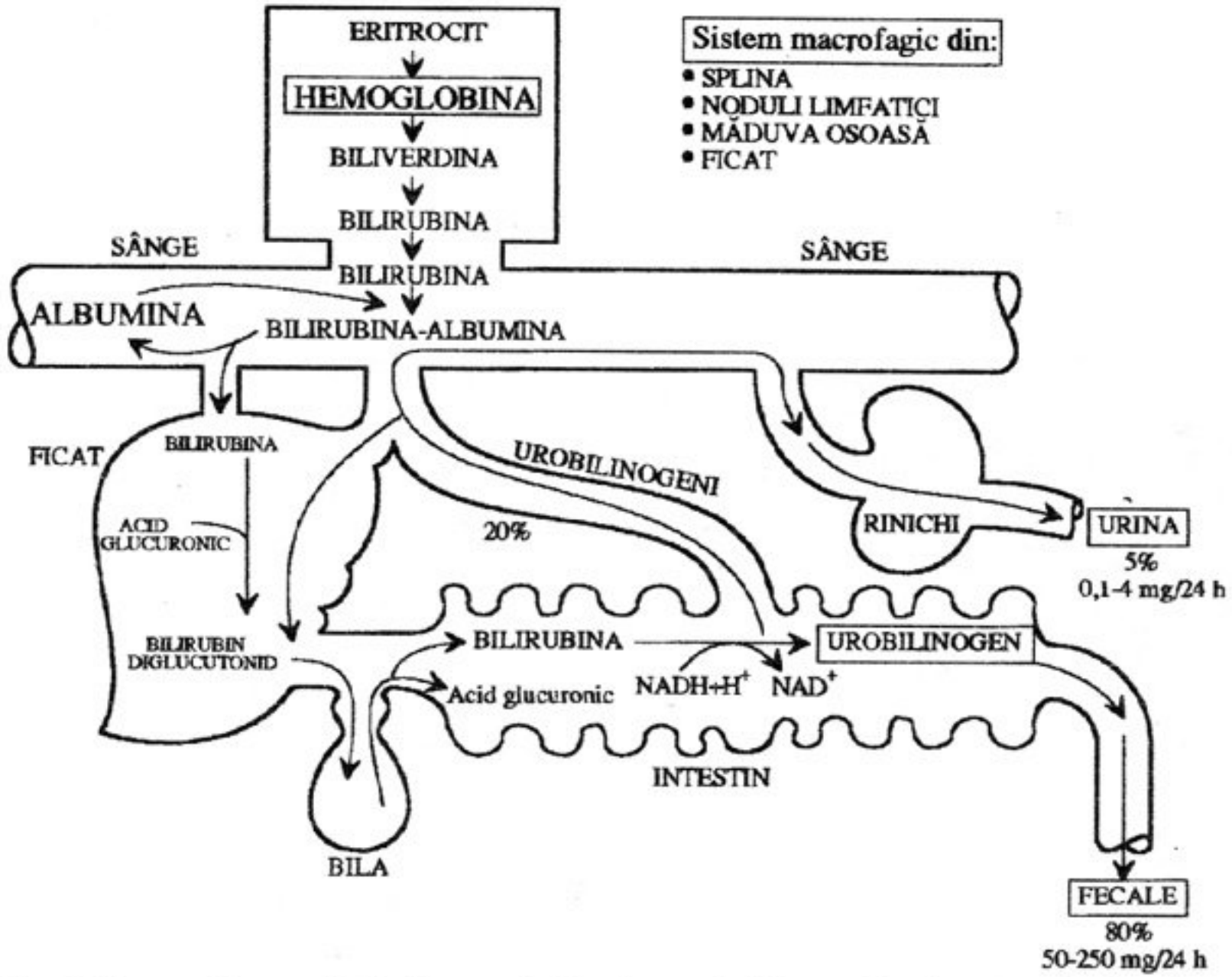
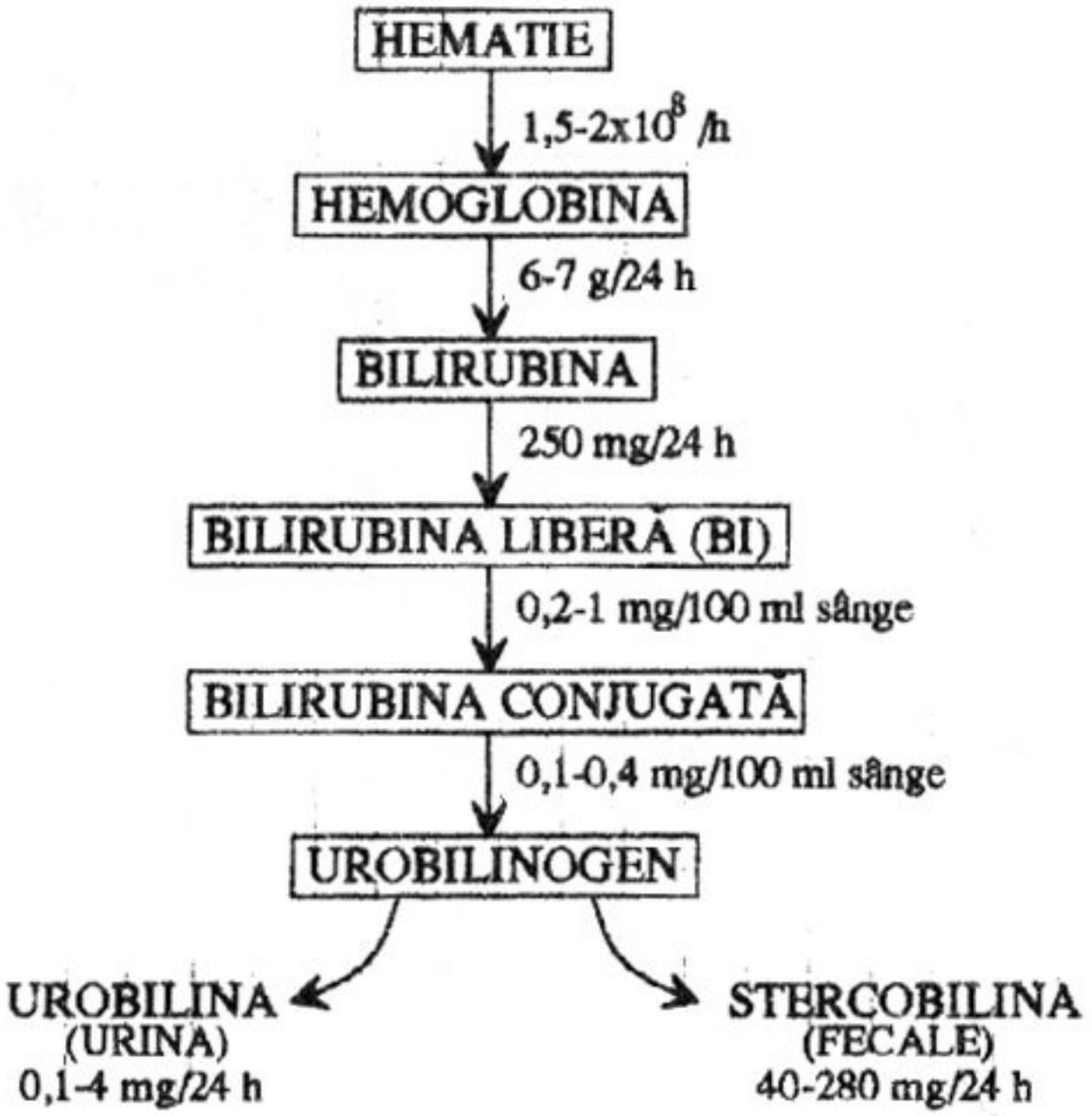



Fig.IV.11. **Catabolizarea hemoglobinei apreciată prin variațiile cantitative ale principalilor cataboliți**

Într-o proporție de 80%, aceste trei componente se elimină prin fecale (40-280 mg/24 h), restul de 20% sunt reabsorbite din intestin și intră în circulația enterohepatică.




Pigmenții biliari reabsorbiți sunt în cea mai mare proporție receptați de către ficat și eliminați prin bilă, astfel că numai 2-5% din întreaga cantitate sunt distribuiți prin marea circulație la rinichi și eliminați prin urină. Așa se explică de ce prin urină nu se excretă, în mod normal, decât până la maximum 4 mg/24 ore de urobilinogen.

Este necesar să precizăm faptul că 15% din bilirubina formată zilnic, se obține și din alte componente decât hemoglobina:

- mioglobina, citocromi, catalaze, peroxidaze;
- precursori ai sintezei celulei roșii.

Într-o sinteză a variațiilor lor cantitative prezentăm în figura IV.11. valorile normale ale intermediarilor metabolici de la lizarea hematiilor până la eliminarea hemoglobinei transformată în diferiți cataboliți până la urobilinogen prin fecale, respectiv prin urină.

Fracțiunile de bilirubină au fost separate prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).

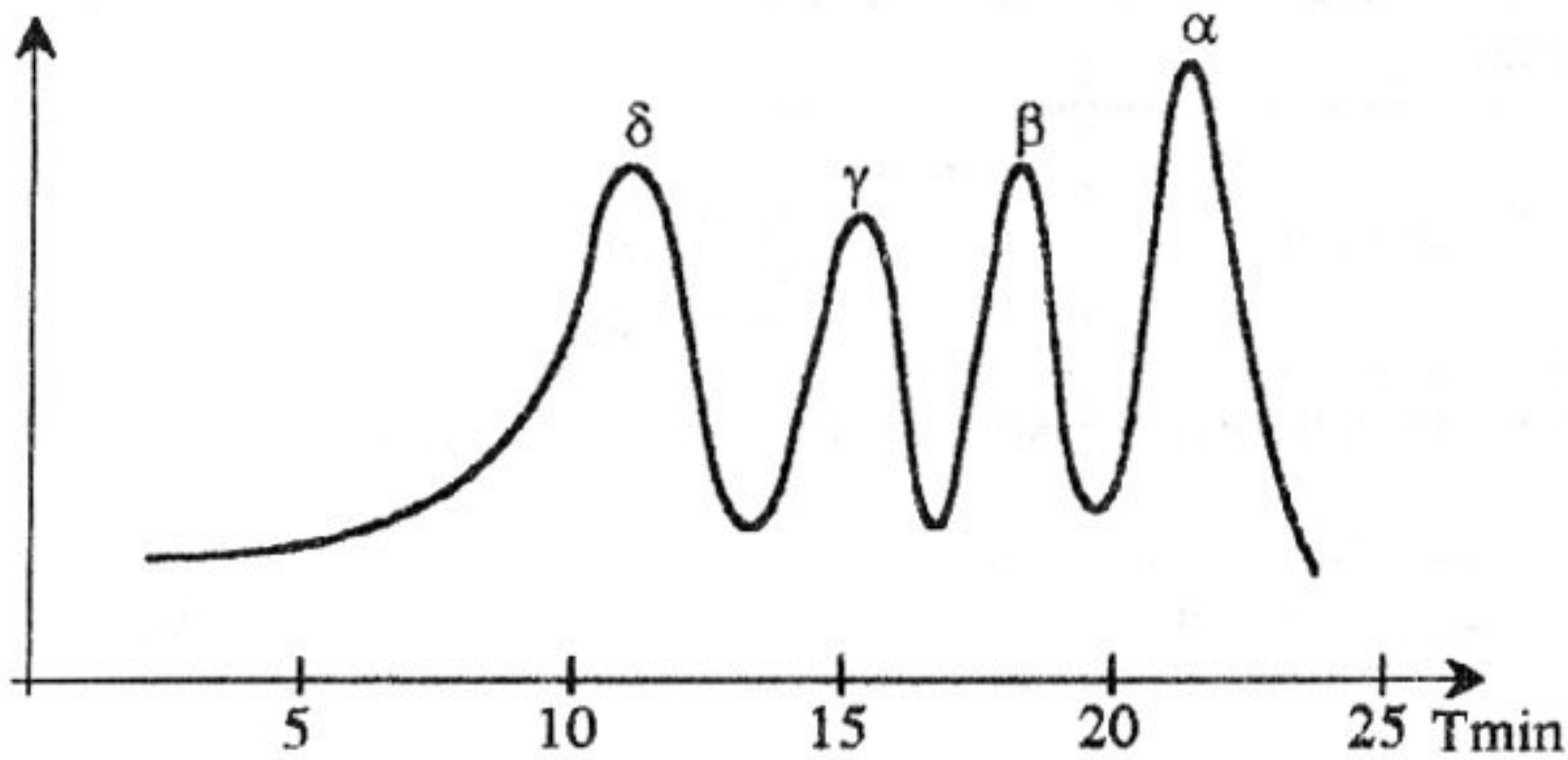



**Fig.IV.12. Cromatograma fracțiunilor bilirubinei**

α - bilirubina neconjugată;

β - bilirubin monoglucuronid;

γ - bilirubin diglucuronid;

δ - bilirubin albumina.

Se poate considera că bilirubina totală este suma tuturor celor patru forme:

$$B_T = B\alpha + B\beta + B\gamma + B\delta$$

Bilirubina α poate fi asimilată cu bilirubina liberă, neconjugată sau indirectă. Bilirubina conjugată (monoconjugată, diconjugată și legată de albumină) constituie bilirubina directă.

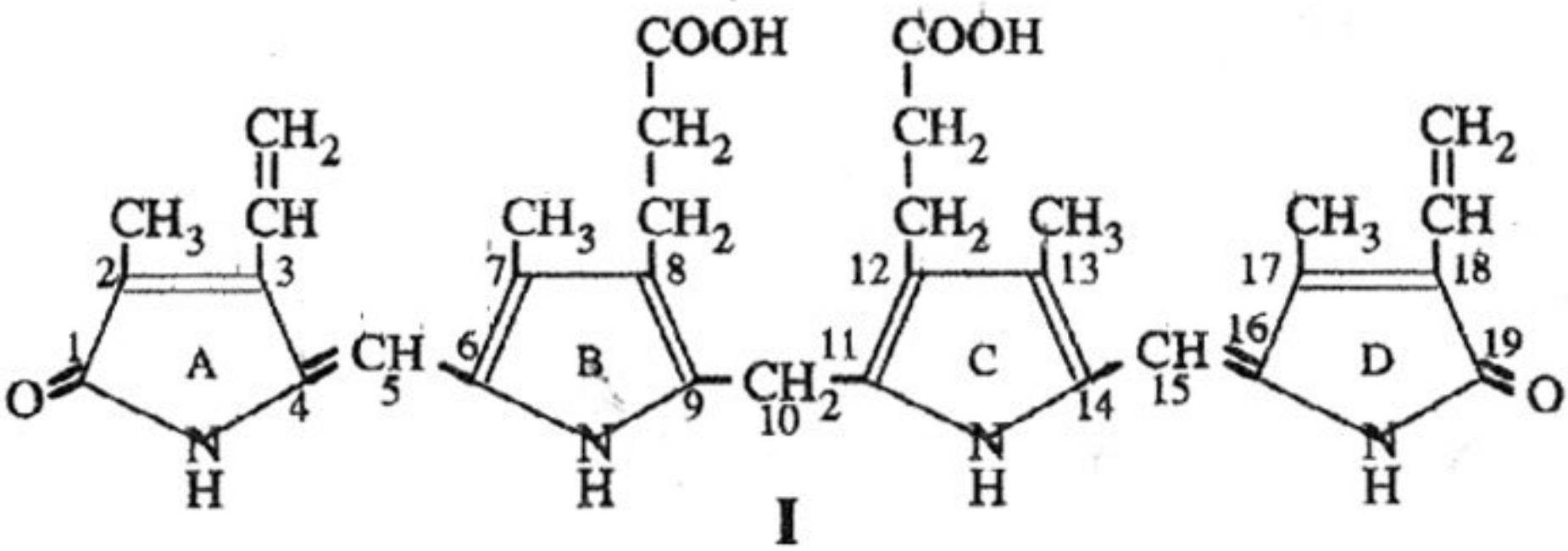
Bilirubina delta (Bδ) separată prin metode cromatografice reprezintă o parte a bilirubinei directe și este utilă în diagnosticul diferitelor forme de icter putând fi considerată marker în diferite forme de hepatopatii.

Cele două forme ale bilirubinei au proprietăți fizico-chimice și biologice distincte, care pot fi privite comparativ.

Tabelul IV.11. **PROPRIETĂȚILE FORMELOR DE BILIRUBINĂ**

| Proprietatea | Bilirubina indirectă | | Bilirubina directă |
|---|---|---|---|
| ◆ reacția diazo | întârziat | | imediat |
| ◆ solubilitatea | lipide | | apă |
| ◆ toxicitatea | da | | nu |
| ◆ sediul de formare | Sistem macrofagic | • splină<br>• ficat<br>• măduvă | ficat |
| ◆ direcția căii de transport | sistem macrofagic → → ficat | | ficat → bilă → intestin |
| ◆ concentrația sanguină | 0,2-1 mg/100 ml | | 0,1-0,4 mg/100 ml |

Deși structura chimică a bilirubinei a fost stabilită de multă vreme (Fischer-Pleninger, 1942), de curând s-a înțeles gradul său mare de insolubilitate în apă, respectiv de solubilitate în lipide.



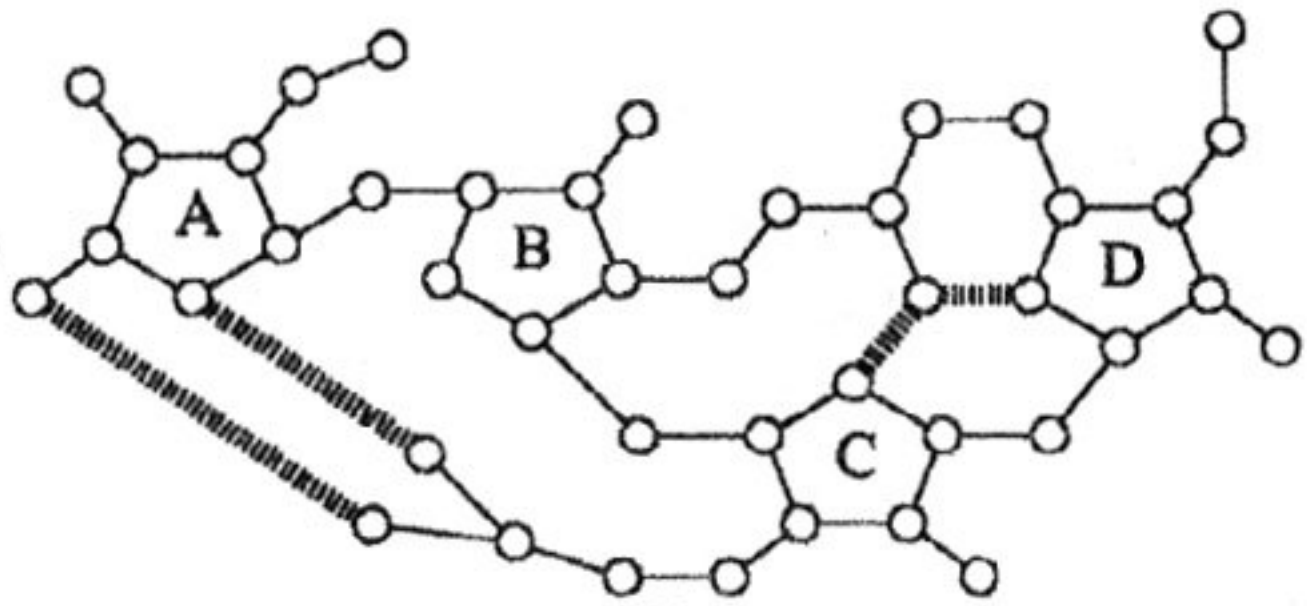




Fig.IV.13. **Structura bilirubinei.**

**I. Imaginea sa realizată prin difracția cu raze X**

**II. Configurația "Z" a bilirubinei**

Studii cristalografice ale bilirubinei cristalizate, realizate prin difracția cu raze X, au dus la constatarea că ciclurile A și B, respectiv C și D se află în poziție "trans", iar grupările carboxil ale celor doi radicali propionil și hidrogenul iminic din ciclurile A și D formează punți de hidrogen (vezi figura IV.13.).

În aceste condiții, bilirubina liberă (indirectă) devine insolubilă în apă, dar poate deveni mai solubilă prin expunerea la lumină a acestor punți de hidrogen.

Așa se explică de ce, prin adăugarea de substanțe ce desfac punțile de hidrogen, ca metanolul, etanolul, ureea, cofeina, reacția Van der Bergh devine pozitivă, bilirubina reacționând imediat cu acidul sulfanilic diazotat.

De asemenea, s-a înțeles și de ce prin formarea bilirubin diglucuronidului, compusul devine solubil în apă și insolubil în lipide, formarea punților de hidrogen fiind împiedicată, caracterul hidrofil al acidului glucuronic conducând la creșterea solubilității bilirubinei în apă și fluidele organismului.

### *IV.5.3. HIPERBILIRUBINEMIA*

Bilirubinemia crește în toate sindroamele icterice.

Din punct de vedere patogenic, icterele se clasifică în:

- ictere **hemolitice**;
- ictere **mecanice**;
- ictere **hepatice**, cu precizarea nivelului la care intervin factorii etiopatologici în metabolismul bilirubinei, de la sinteză până la eliminare.

- În **icterul hemolitic**, sistemul macrofagic catabolizează multă hemoglobină astfel că în compartimentul vascular, găsim bilirubina indirectă (BI) crescută.

La nivelul ficatului se elimină prin bilă o cantitate crescută de bilirubină conjugată, (bilirubină directă - BD), astfel că în fecale vom găsi stercobilinogenul crescut.

Circuitul enterohepatic va fi accentuat, se resoarbe activ urobilinogenul, ceea ce va duce, la eliminarea sa masivă în urină (figura IV.14.).

În icterul hemolitic, bilirubina variază astfel: **bilirubină totală crescută, bilirubină indirectă crescută** și **urobilinogen crescut.**

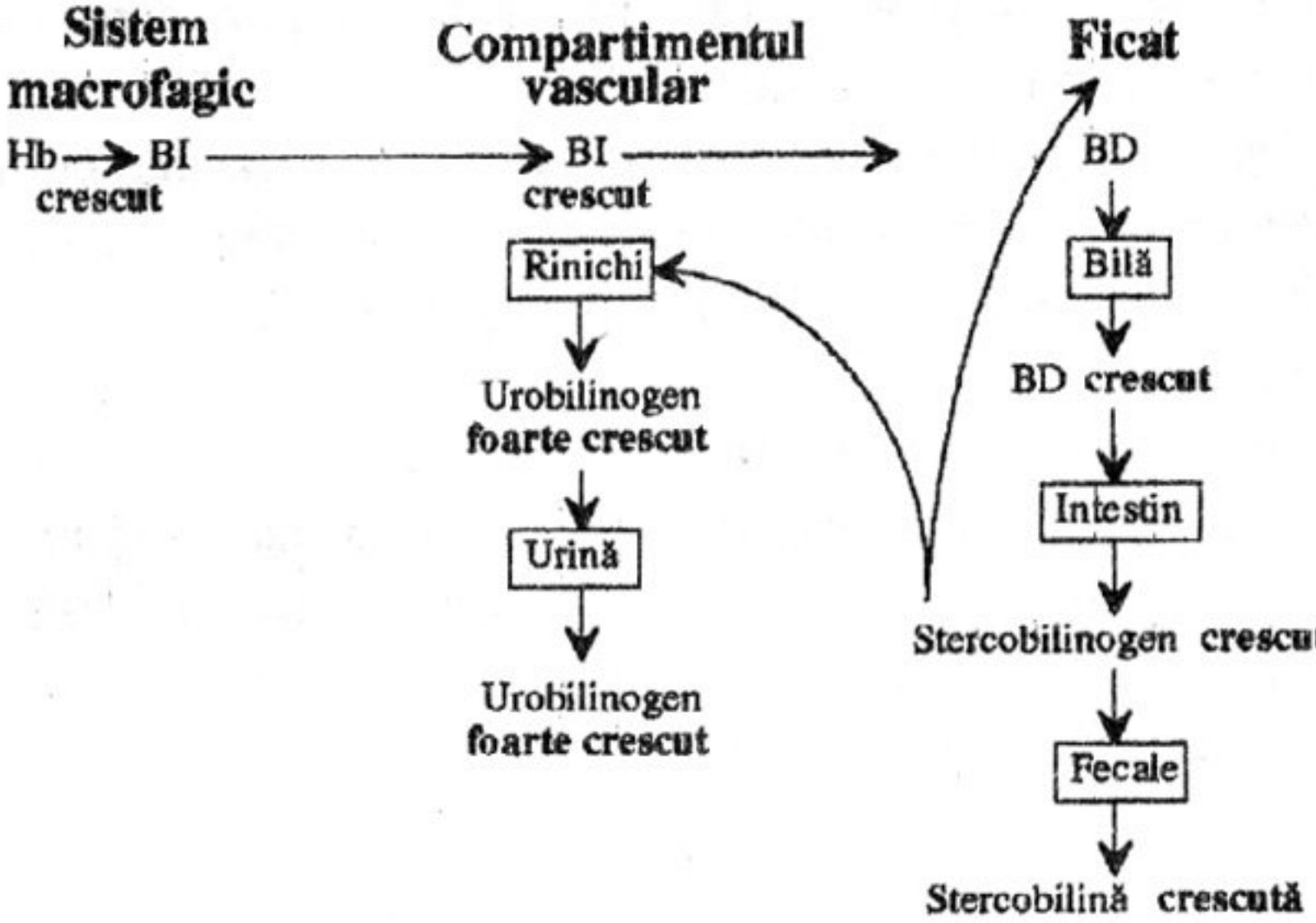



Fig.IV.14. **Circuitul bilirubinei în icterul hemolitic**

◆ În **icterul mecanic**, producerea bilirubinei în sistenul macrofagic este normală, astfel că bilirubina indirectă, în compartimentul vascular, va fi între limite fiziologice. Din cauza obstacolului biliar, bilirubina directă produsă în ficat nu se va elimina și va trece în circulație, unde va atinge valori crescute, trecând apoi în urină. Circuitul enterohepatic va fi nul, iar la nivelul intestinului și în fecale stercobilinogenul este absent (figura IV.15.).

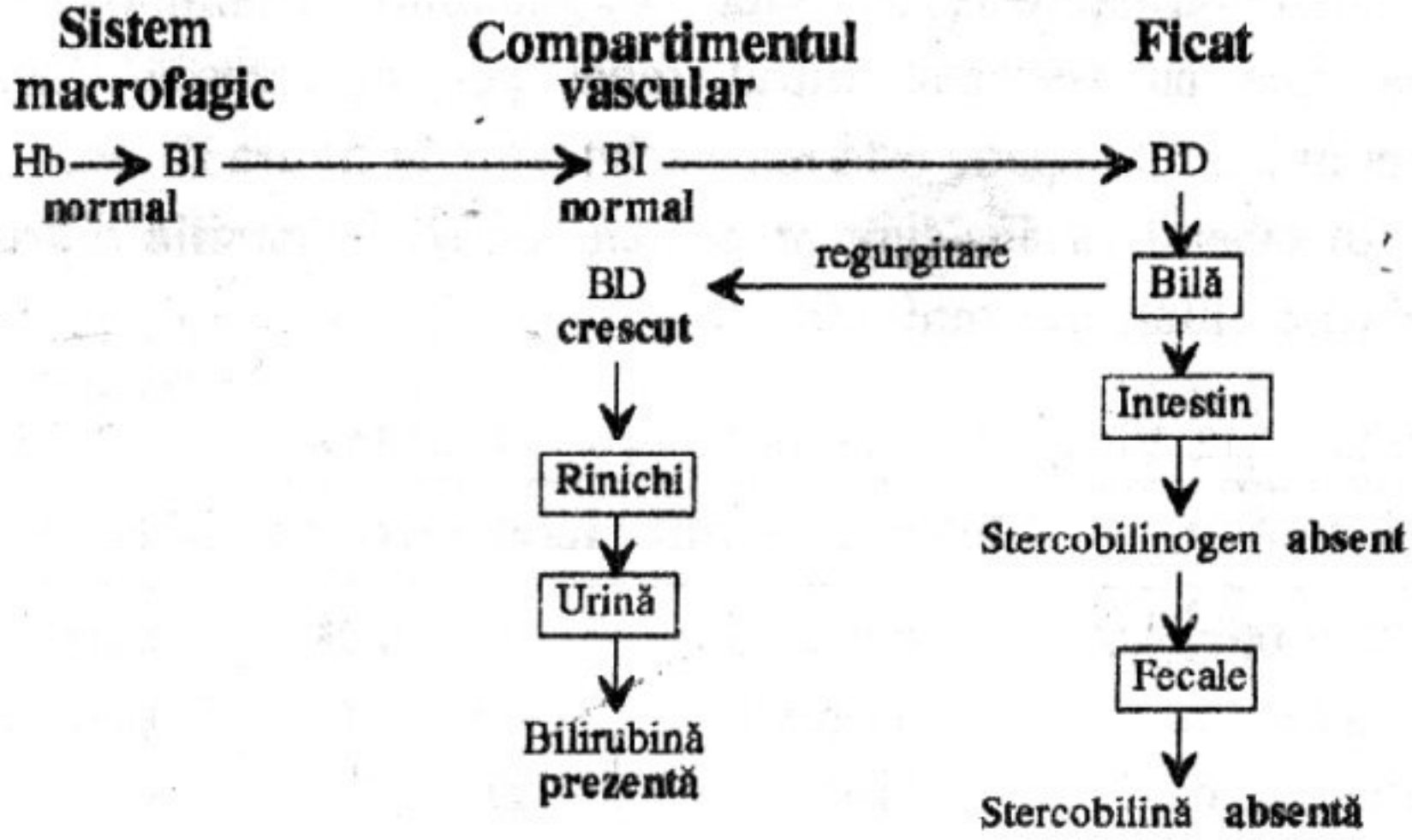



Fig.IV.15. **Circuitul bilirubinei în icterul mecanic**

◆ În **icterul hepatic**, producerea de bilirubină în sistemul macrofagic este normală, bilirubina indirectă în sânge este crescută, deoarece ficatul este afectat, iar conjugarea ei și eliminarea bilirubinei prin bilă se face insuficient. La nivelul bilei, concentrația bilirubinei directe va fi scăzută, aproape toată bilirubina directă ajungând în plasmă unde-i va crește concentrația.

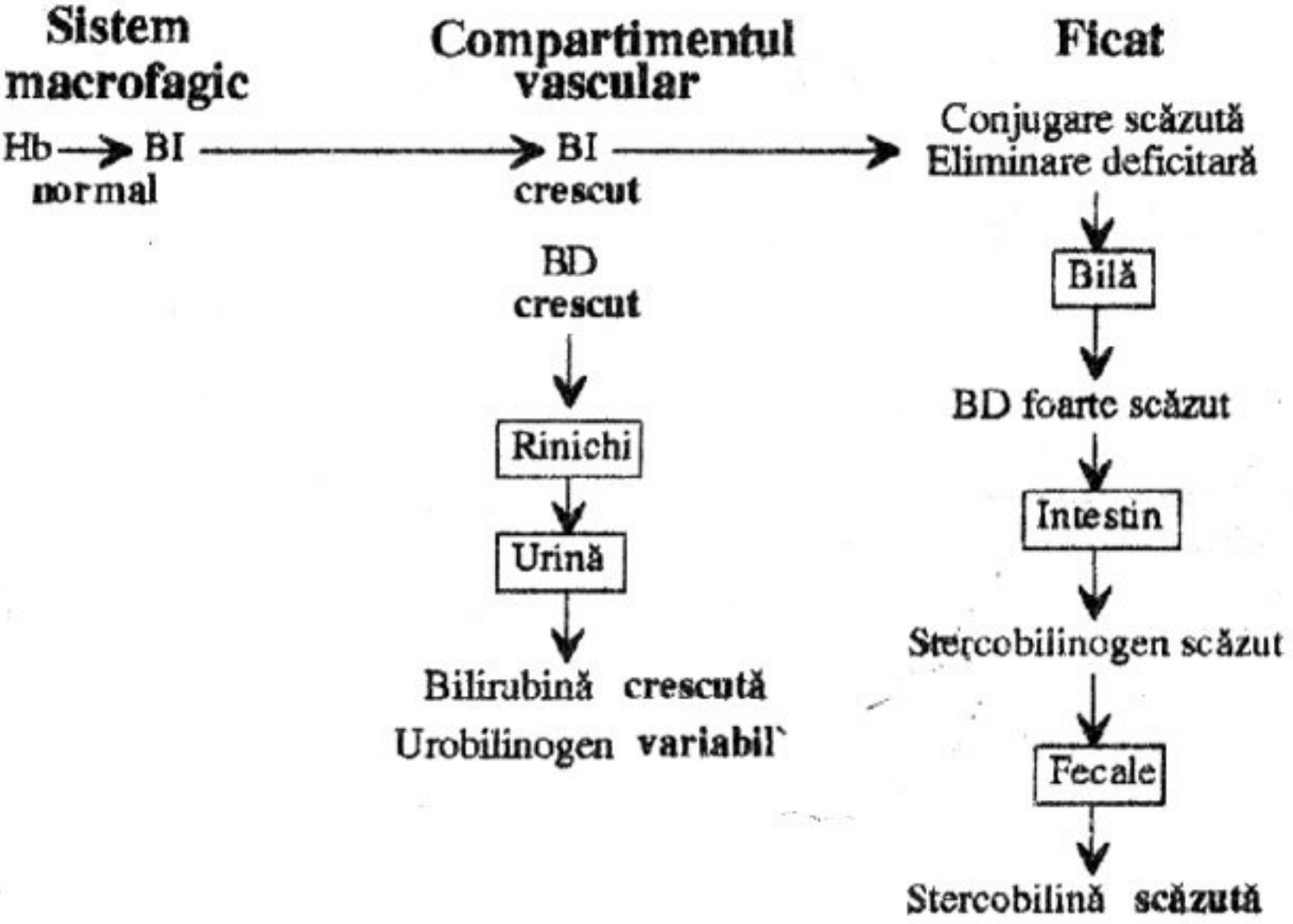



Fig.IV.16. **Circuitul bilirubinei în icterul hepatic**

Stercobilina este scăzută, în schimb urobilinogenul și bilirubina care au traversat filtrul renal pot să crească. Circuitul bilirubinei în icterul hepatic este redat schematic în figura IV.16.

În tabelul IV.12. sunt prezentate sintetic variațiile bilirubinei și pigmenților biliari în ictere.

Tabelul IV.12. **VARIAȚIILE PIGMENȚILOR BILIARI ÎN ICTERE**

| Component | Icter hemolitic | Icter mecanic | Icter hepatic |
|---|---|---|---|
| Bilirubina totală | crescută | crescută | crescută |
| Bilirubina directă | normal | crescută | crescută |
| Bilirubina indirectă | crescută | normală | crescută |
| Stercobilina | crescută | absentă | scăzută |
| Urobilinogen | crescut | absent | variabil |

### *IV.5.4. METODE DE DOZARE A BILIRUBINEI*

Metodele de dozare a bilirubinei serice utilizează reacția diazo (Van der Bergh) care constă din cuplarea bilirubinei cu acid sulfanilic diazotat obținându-se un complex diazoic colorat în roz-purpuriu.

#### *IV.5.4.1. METODA VAN DER BERGH*

**Principiul metodei.** Bilirubina se află în ser sub formă de bilirubină liberă (indirectă) și bilirubină conjugată (monoglucuronid și diglucuronid, directă). Bilirubina conjugată reacționează direct cu acid sulfanilic diazotat dând un azopigment intens colorat. Bilirubina liberă reacționează indirect, numai după ce a fost desfăcută din legătura cu proteinele și solubilizată. Deci tratând serul direct cu acid sulfanilic diazotat se obține coloratie datorită numai bilirubinei directe, iar prin tratare preliminară cu un accelerator anionic (cafeină, benzoat) și apoi cu acidul sulfanilic diazotat se obține coloratia datorită bilirubinei totale. Compușii azoici manifestă proprietăți de indicatori, astfel încât se măsoară extincția pigmentului în mediu acid sau neutru (pentru

bilirubina conjugată) și în mediu puternic alcalin (coloraţia albastră) pentru bilirubina totală.

**Reactivi**

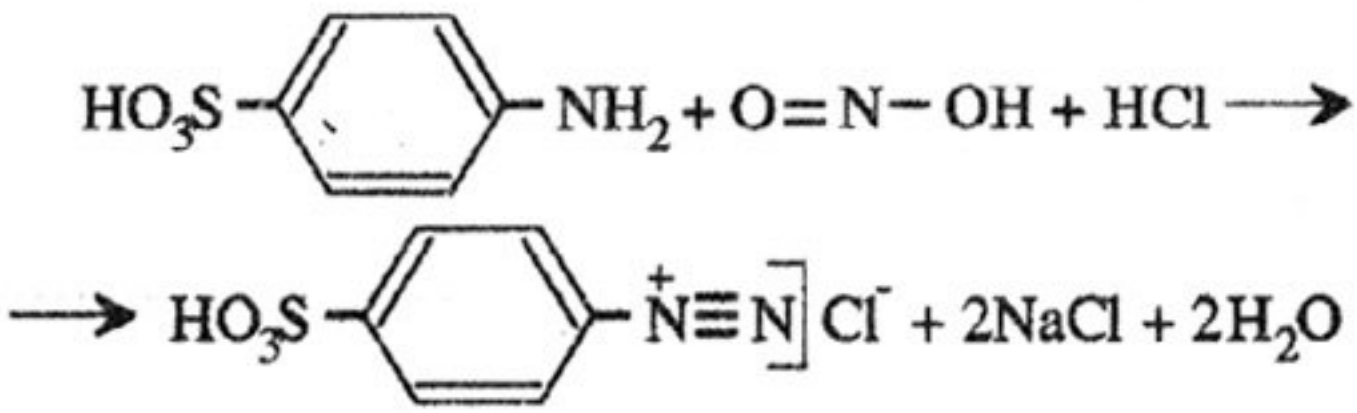
• acid sulfanilic 29 mM în HCl 0,17 N: se dizolvă 1,25 g acid sulfanilic și 3,5 ml HCl (d = 1,19) în 250 ml apă distilată;

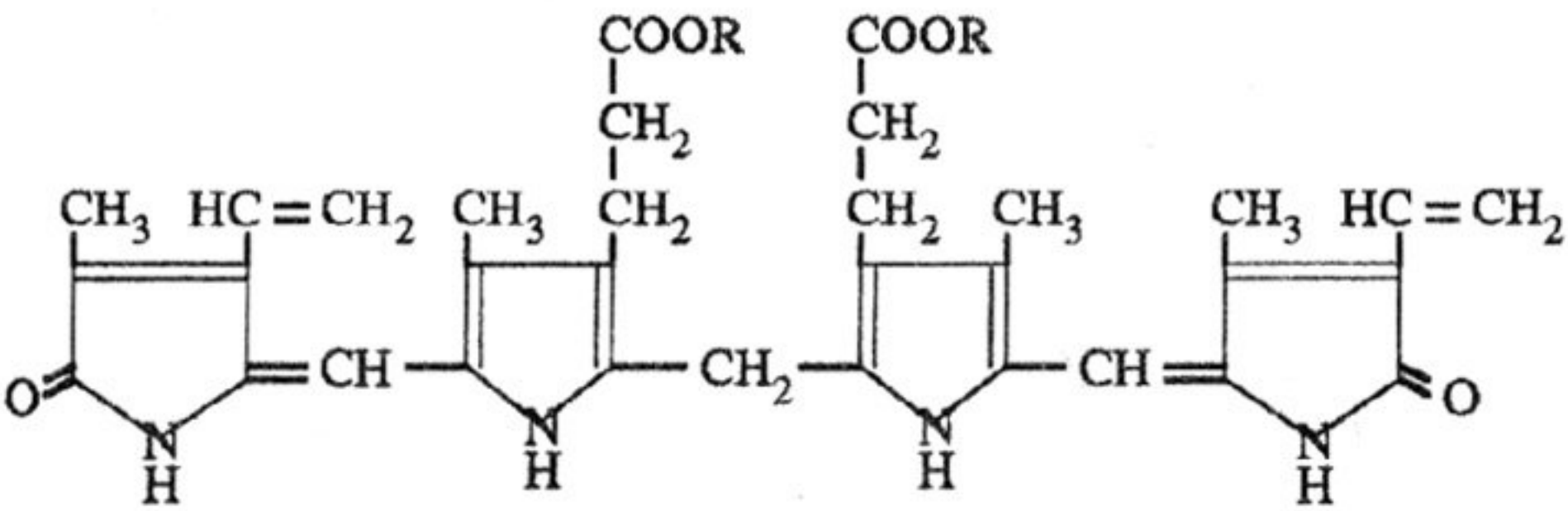
• nitrit de sodiu 25 mM: se dizolvă 175 mg nitrit de sodiu în 100 ml $H_2O$ distilată. Se conservă la rece, în sticlă brună, bine închisă timp de o săptămână;

• accelerator: cafeină 0,26 M, benzoat 0,52 M; se dizolvă 13,75 g cafeină și 18,75 g benzoat de sodiu în 200 ml apă, încălzind până la fierbere și completând după răcire la 250 ml cu apă;

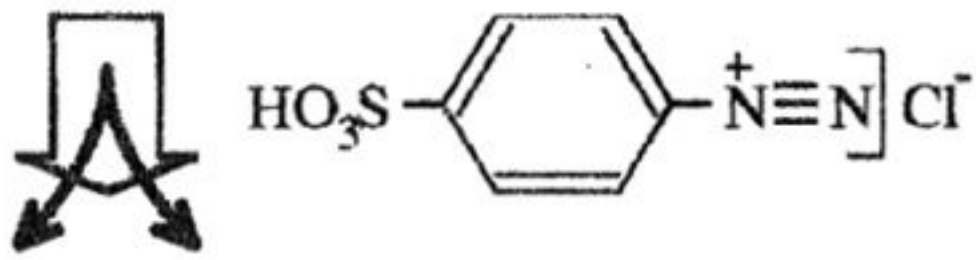
• tartrat alcalin: tartrat 0,93 M, hidroxid de sodiu 1,9 M: se dizolvă 65 g tartrat de sodiu - potasiu (sare Seignette) și 19 g NaOH în 200 ml apă și se aduce la 250 ml cu apă;

• clorură de sodiu: soluție 0,9% (ser fiziologic).




**[BILIRUBINA]**



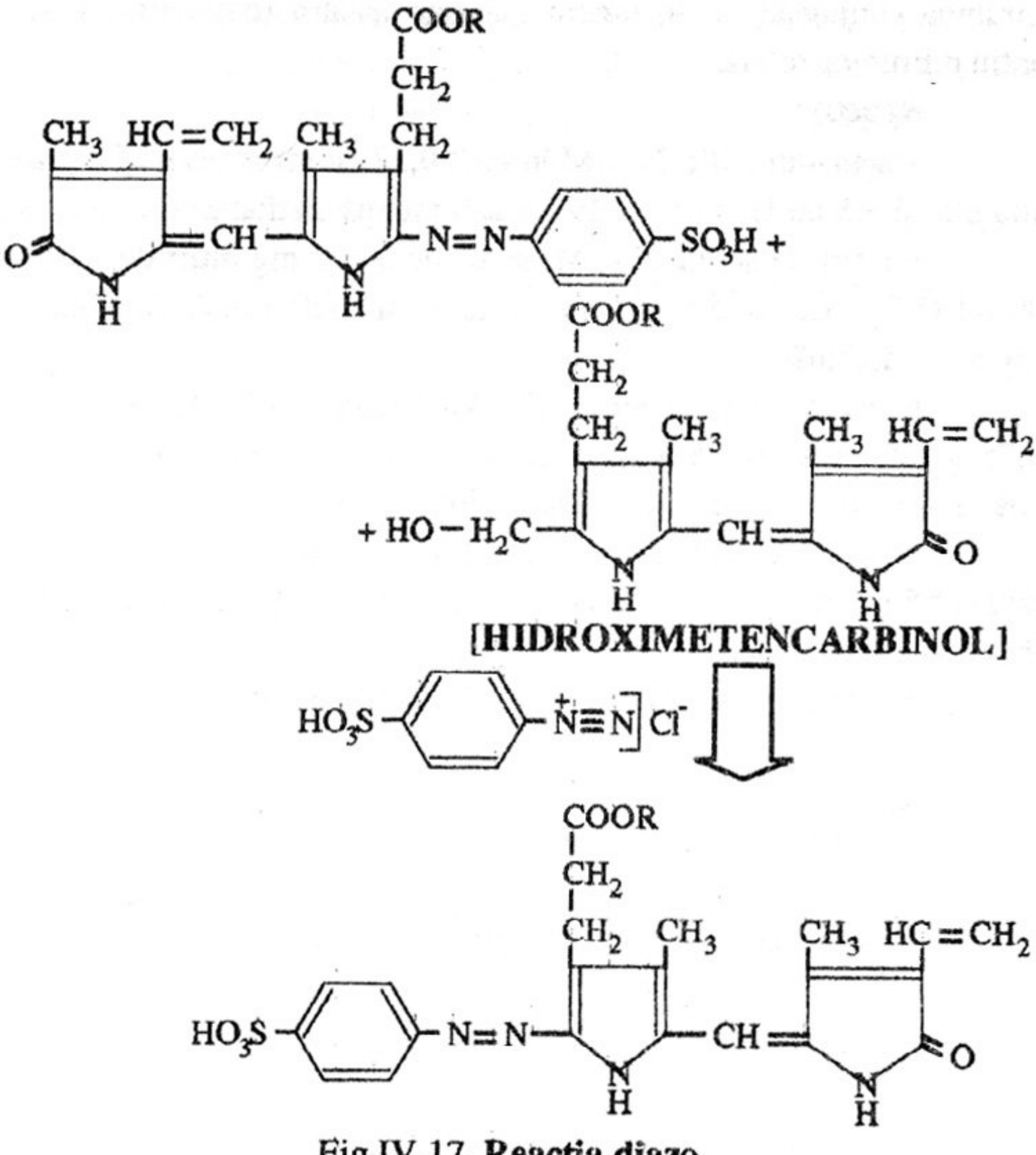



Fig.IV.17. **Reacția diazo**

a) Dozarea bilirubinei directe

Se pipetează în eprubete probele conform schemei:

| **Reactivi** | **PD** | **BD** |
|---|---|---|
| Acid sulfanilic | 0,25 | 0,25 |
| Nitrit de sodiu | 1 picătură (0,05 ml) | - |
| Clorură de sodiu | 2,00 | 2,00 |
| Ser | 0,5 | 0,5 |

Se amestecă și după exact 5 minute se măsoară extincția fiecărei probe (EPD) față de blancul corespunzător (EBD) la 530 nm, în cuvă de 1 cm.

**Calcul.** Coeficientul de extincție procentual al azopigmentului la 530 nm este $a^{530} = 943$, de unde $E^{530}$ 1 mg/100 ml = 0,943. Volumul probei, $V_P = 0,5$ ml și volumul final $V_F = 2,8$ ml, deci $\frac{E^{530}}{0,943} \times \frac{2,8}{0,5}$ = mg bilirubină/100 ml,

adică: | EPD x 5,9 = mg bilirubină directă/100 ml ser |

b) Dozarea bilirubinei totale

Se pipetează în eprubete:

| Reactivi | PT | BT |
|---|---|---|
| Acid sulfanilic | 0,25 | 0,25 |
| Nitrit de sodiu | 1 picătură (0,05 ml) | - |
| Accelerator | 2,00 | 2,00 |
| Ser | 0,25 | 0,25 |
| Se amestecă și se lasă 10-30 minute la temperatura camerei. | | |
| Tartrat alcalin | 1,00 | 1,00 |

Se amestecă și după 5-30 minute se măsoară extincția probelor (EPT) față de blanc (EBT) la 600 nm, în cuvă de 1 cm.

**Calcul.** Coeficientul de extincție procentual al azopigmentului alcalin este $a^{600} = 1150$, de unde $E^{600}$ mg/100 ml = 1,15. Volumul probei $V_P = 0,25$ ml și volumul final $V_F = 2,55$ ml, deci: $\frac{E^{600}}{1,15} \times \frac{2,25}{0,25}$ = mg bilirubină/100 ml,

adică: | EPT x 8,9 = mg bilirubină totală/100 ml ser |

| Bilirubina indirectă = Bilirubina totală - Bilirubina indirectă |
|---|

**Observații.**

Deoarece realizarea unui standard de bilirubină este foarte anevoioasă, se lucrează cu factorul calculat pe baza coeficientului de extincție al azopigmentului la lungimi de undă bine definite.

Dacă (la seruri foarte icterice) extincția măsurată depășește 0,9, se repetă determinarea cu serul diluat 1/2 - 1/4 cu clorură de sodiu 0,9%, iar rezultatul se înmulțește cu factorul de diluție.

## IV.6. FIERUL

### *IV.6.1. METABOLISMUL FIERULUI*

Fierul reprezintă cel de-al treilea element constitutiv al hemoglobinei, deținând prin urmare un rol important în buna desfășurare a funcțiilor vitale ale organismelor evoluate prin participarea sa directă în transportul oxigenului.

Acesta nu este singurul rol, deoarece fierul intră în alcătuirea a numeroase componente cu roluri de neînlocuit în angrenajul biologic al organismului uman.

Datorită rolurilor sale complexe, aprecierea cantitativă a compușilor în care fierul este prezent este de o mare importanță biologică și medicală.

În organismul uman, fierul se găsește într-o cantitate de 4-5 g, fiind totuși încadrat în rândul microelementelor, deoarece atât în sânge cât și în celule nu se găsește liber decât într-o foarte mică proporție.

Fierul este prezent în două grupe principale de compuși biologici:

- compuși **heminici** - în care gruparea prostetică ce conține fier - hemul este legat de proteină: hemoglobină, mioglobină, citocromi, catalaze, peroxidaze;
- compuși **neheminici** - în care fierul este legat direct de anumite proteine: feritina, transferina, lactoferina, hemosiderina.

Tabelul IV.13. **COMPUȘI CU FIER DIN ORGANISMUL UMAN**

| Compuși | Masă mol. | Nr. atomi de fier/mol proteină | Localizare | Funcție biologică |
|---|---|---|---|---|
| ◆ HEMINICI | | | | |
| • hemoglobina | 68000 | 4 | hematii | • transport de oxigen |
| • mioglobina | 17000 | 1 | mușchi | • depozit de oxigen |
| • citocromul b | 28000 | 1 | mitocondrii | • transport de electroni |
| • citocromul c | 12000 | 1 | mitocondrii | • transport de electroni |
| • citocromul $P_{450}$ | 40000 | 1 | sistem macrofagic | • transport de electroni |
| • catalaza | 240000 | 4 | peroxizomi | • degradare $H_2O_2$ |
| • peroxidaza | 44000 | 1 | peroxizomi | • degradare $H_2O_2$ |
| ◆ NEHEMINICI | | | | |
| • transferina | 80000 | 2 | plasmă | • transport de fier |
| • lactoferina | 80000 | 2 | lapte, salivă | • transport de fier |
| • feritina | 560000 | 20 | ficat, splină | • depozit de fier |
| • hemosiderina | 900000 | 37 | măduvă osoasă | • depozit de fier |
| • xantinoxidaza | 275000 | 8 | lapte, ficat | • transport de electroni |

Circuitul metabolic al fierului este deosebit de riguros controlat de diverse sisteme de reglare biologice, astfel încât după vârsta de 20 de ani, în mod normal cantitatea totală a fierului, ca și a principalelor componente ce au roluri în metabolismul acestui microelement se mențin între anumite limite.

În figura IV.18. sunt prezentate principalele aspecte metabolice legate de fier și compușii în care este prezent.

Din analiza figurii IV.18. remarcăm faptul că majoritatea fierului este prezent în hemoglobină - hematii -, și anume 2,5-3 g, ceea ce reprezintă 60-65% din totalul său, catabolismul și sinteza fiind perfect echilibrate - 25 mg/zi, ca și excreția și absorbția fierului din alimente - 0,5-1,5 mg/zi. Trebuie recunoscut faptul că numai o proporție de 5-10% din cantitatea de fier cuprinsă în alimente pătrund în organism, restul eliminându-se.

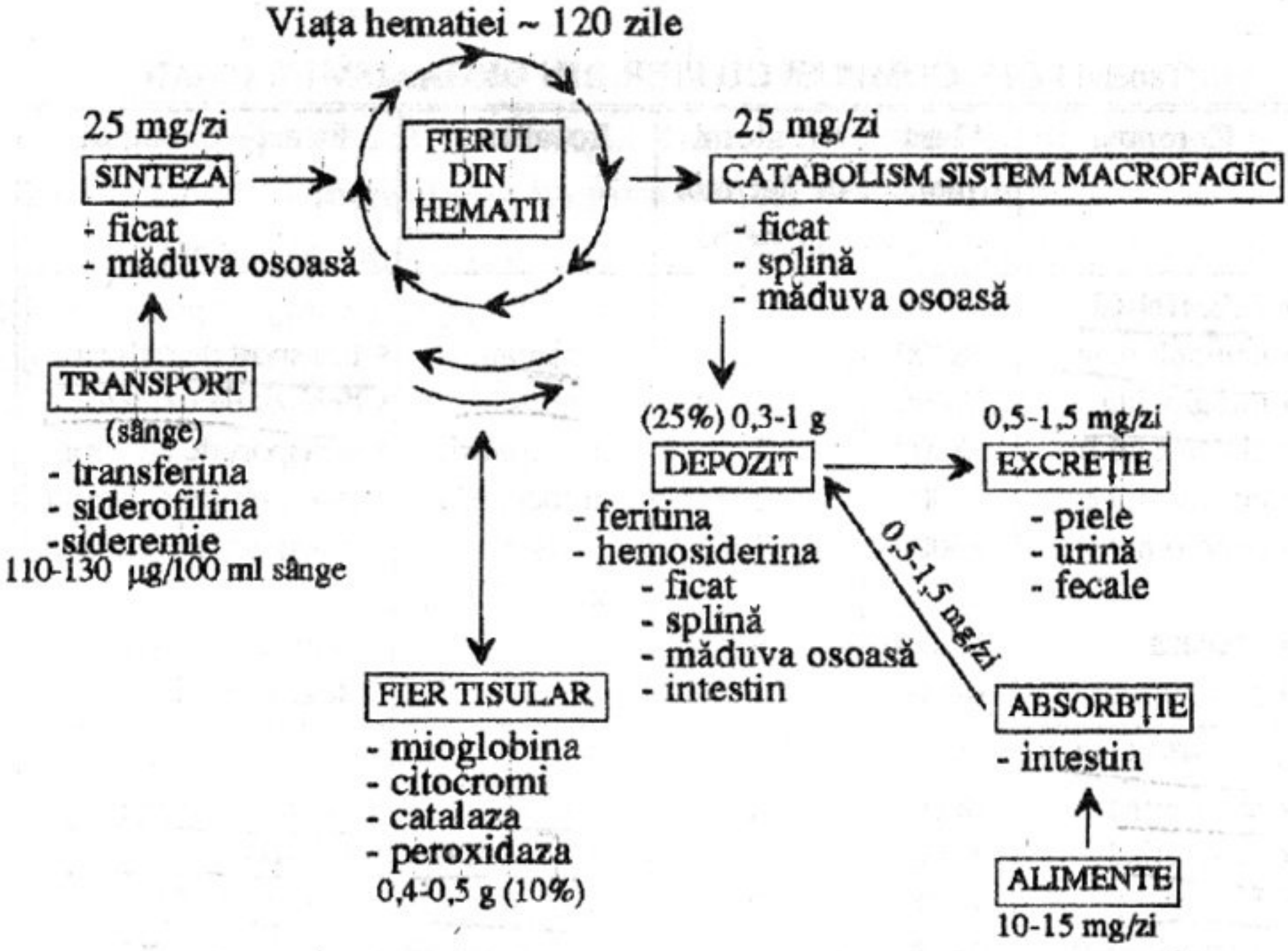



**Fig.IV.18. Aspecte metabolice ale fierului**

**Depozitarea** fierului ce se eliberează după degradarea hematiilor ajunse la vârsta de 120 zile se face la nivelul sistemului macrofagic din ficat, splină, măduvă osoasă și intestin, prin captarea sa în mod specific de către două proteine specializate în acest scop, și anume **feritina** și **hemosiderina.**

Feritina este principalul compus proteic de stocare a fierului în organism. Este prezentă aproape în toate celulele, dar mai ales în ficat, măduva osoasă și splină.

Hemosiderina, cealaltă proteină specializată în acceptarea fierului, este puțin solubilă în apă, iar fierul legat de ea se eliberează mult mai greu. Localizarea sa are loc cu precădere tot în ficat, splină și măduva osoasă.

**Transportul** fierului prin sânge se desfășoară prin intermediul **transferinei.** Această proteină este o β-globulină cu mare capacitate de legare a fierului și care servește și pentru transportul intracelular al fierului, putând pătrunde în citosol.

**Fierul tisular** este reprezentat cu precădere de către **mioglobină**, proteină care prezintă o similitudine structurală cu lanțurile polipeptidice ale hemoglobinei, dar este formată dintr-un singur lanț; concentrația totală a fierului inclus în mioglobină se apreciază a fi în jurul valorii de 130 mg.

Numeroase alte enzime tisulare sau coenzime necesită fier, fie prezent într-o grupare prostetică, fie drept cofactor, cele mai răspândite fiind peroxidazele și citocromii. De asemenea, trebuie menționat că aproape jumătate din enzimele ciclului Krebs conțin fier, într-o concentrație totală de 8 mg.

Există și un **sector labil** al fierului (**"labile pool"**) cuprinzând aproximativ 80 mg fier. Acest compartiment, care nu are o localizare anatomică precisă, a fost dedus din cercetări efectuate cu izotopi radioactivi și se pare că este o etapă de tranziție rapid integrată în metabolismul fierului.

Un aspect important demn de menționat este faptul că, la naștere, nou născutul nu are decât o cantitate cuprinsă între 250 și 400 mg fier, prezentă evident cu precădere în hemoglobină. Aceasta implică faptul că până la vârsta de 20 de ani, de la care concentrația fierului rămâne relativ constantă, se produc acumulări medii de 180-220 mg/an.

În cursul vieții intrauterine are loc un transfer de fier de la mamă la făt prin intermediul placentei care are o mare capacitate de a extrage fierul din sângele matern.

Aceasta presupune deci ca în timpul sarcinii să se facă o suplimentare cu alimente ce conțin fier. După primele zile de viață, principala sursă de fier a copilului este laptele matern, acesta având un conținut mic de fier de 0,5 mg/l, dar este rapid absorbit de către copil.

### *IV.6.2. VALORI NORMALE. PATOLOGIA FIERULUI*

Deoarece hemoglobina este alcătuită din trei componente distincte: globina formată din 4 lanțuri polipeptidice, gruparea prostetică (protoporfirina IX) și fierul (II), fiecare cu un metabolism propriu, evident că există o multitudine de defecte - anabolice sau catabolice, ce pot apărea la nivelul fiecărei verigi.

Așa se explică de ce studiul normal al hemoglobinei în ansamblul ei a devenit o știință de sine stătătoare - **hematologia.**

În ceea ce privește fierul, este clar că există numeroase cauze ce pot determina tulburări ale absorbției, transportului prin sânge, integrării în protoporfirina IX pentru a se forma hemul și apoi în ceea ce privește ciclul său catabolic.

Variațiile fierului din sânge - **sideremia** - sunt determinate de cauze fiziologice și patologice. Cele fiziologice sunt determinate de sex, ritmuri diurne (seara valorile scăzând cu 10-30%), vârstă, sarcină, ciclu menstrual etc.

Tabelul IV.14. **VALORILE NORMALE ALE SIDEREMIEI**

| Proveniență | Vârstă, sex | µmol/l | µg/100 ml | Metoda |
|---|---|---|---|---|
| Ser | nou născut | 19,3-27,9 | 108-156 | Bathofenantrolină |
| | 2 luni | | | |
| | 1-2 ani | 9,5-17,4 | 53-97 | |
| | 2-14 ani | 15,2-26,0 | 85-145 | |
| | bărbați | 16,1-25 | 90-140 | |
| | femei | 14,3-21,5 | 80-120 | |

$\mu mol/100\ ml = \mu mol/l \times 55847 \cdot 10^{-4}$;

$\mu mol/l = \mu g/100\ ml \times 1791 \cdot 10^{-4}$.

Sideremia prezintă, în funcție de vârstă, variații între limite apreciabile, fiind mai mare la naștere, scăzând până în jurul vârstei de 1-2 ani și apoi crescând treptat până în jurul vârstei de 20 de ani, când se stabilizează la valori cuprinse între 90-140 µg/100 ml sânge la bărbați și 80-120 µg/100 ml sânge la femei conform tabelului **IV.14.** (după Radu Mihai Vasile, 1986).

Variațiile patologice se pot încadra, după unele clasificări, în două grupe principale (vezi tabelul IV.15.):

- cu modificări ale concentrației fierului în **ser,** și anume **hipo** și **hipersideremii;**

◆ cu modificări ale concentrației fierului **tisular** ca urmare a unei carențe sau absorbții scăzute (**hiposideroze**) sau absorbții și depozitări excesive (**hipersideroze**).

Tabelul IV.15. **VARIAȚIILE PATOLOGICE ALE FIERULUI**

| **Hiposideremii** | **Hipersideremii** |
|---|---|
| • anemii feriprive;<br>• anemii posthemoragice;<br>• anemiile bolilor maligne;<br>• infecții acute și cronice;<br>• infarct miocardic;<br>• șoc anafilactic și traumatic. | • anemii macromegaloblastice;<br>• anemii hemolitice;<br>• boala lui Basedow;<br>• distrofii neuro vegetative;<br>• hemocromatoza idiopatică;<br>• hepatite acute;<br>• limfogranulomatoza malignă. |
| **Hiposideroze** | **Hipersideroze** |
| ▪ anemia hipocromă a primei copilării;<br>▪ anemia de sarcină;<br>▪ anemiile nutriționale;<br>▪ anemia hipocromă esențială a adultului;<br>▪ cloroza. | ▪ intoxicația acută cu fier;<br>▪ anemia sideroblastică;<br>▪ hemosideroza pulmonară esențială;<br>▪ hemocromatoza esențială;<br>▪ hemosideroze secundare;<br>▪ atransferinemia congenitală. |

Pentru precizarea diagnosticului se pot efectua mai multe analize de laborator din care menționăm:

► determinarea concentrației fierului seric;

► capacitatea totală de fixare a fierului (total iron binding capacity - TIBC).

### *IV.6.3. DETERMINAREA FIERULUI SANGUIN METODA HEILMEYER*

Prin această metodă se determină concentrația fierului legat de transferină și nu este inclus fierul din hemoglobina liberă. Cantitatea sa este scăzută la majoritatea pacienților cu anemii datorate unor deficiențe în fier, tulburări inflamatorii cronice, infecții acute, infarct miocardic.

**Principiul metodei**. La ora actuală există mai multe metode de dozare a fierului, dar cea mai recunoscută în lume este aceea care utilizează ca reactiv bathofenantrolina.

Reacția de dozare implică următoarele etape:

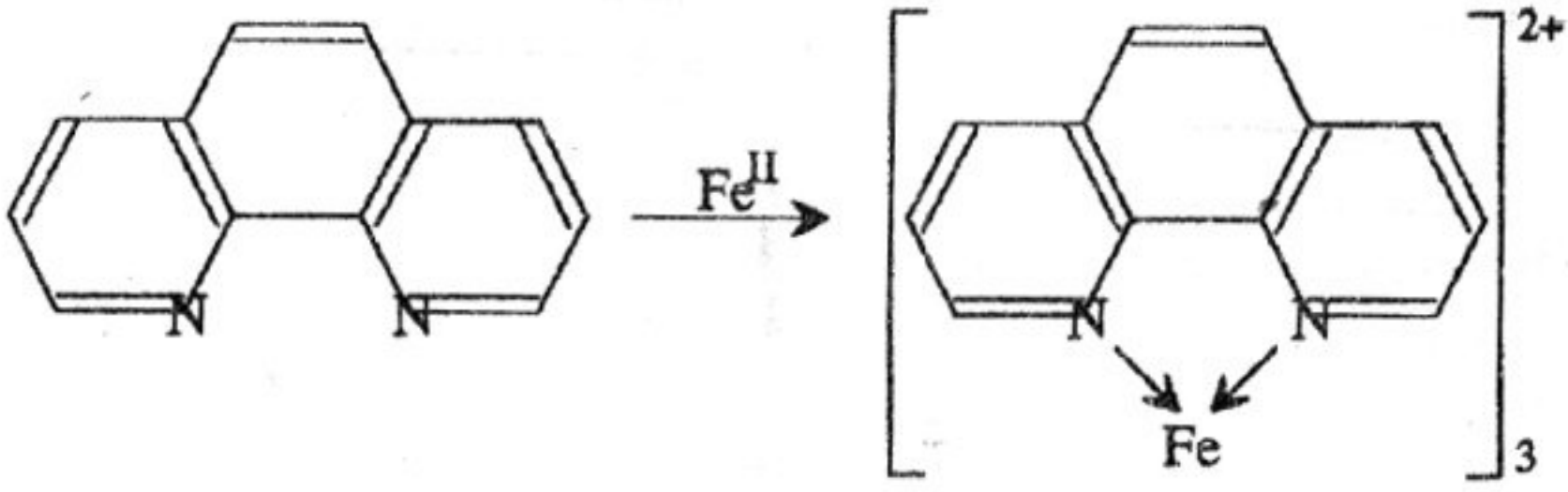
- eliberarea fierului de pe transferină;
- transformarea Fe (III) în Fe (II);
- formarea unui complex colorat între Fe(II) și bathofenantrolină, conform schemei:

a) Transferină - Fe (III) + HCl + Acid tricloracetic → Fe (III) + transferină;

b) Fe (III) + Acid tioglicolic → Fe (II).

c) Fe (II) + Bathofenantrolină (fără culoare) → complex Fe (II) - Bathofenantrolină (colorat).

Reacția finală este dată de schema de mai jos:




**Reactivi**

1. **Soluție deproteinizantă**: se dizolvă 25 g acid tricloracetic și se adaugă 7,5 ml acid tioglicolic 80% în 200 ml acid clorhidric 2 N. Se aduce la 250 ml cu acid clorhidric 2 N.

2. **Soluție de fenantrolină**: A. se dizolvă 125 mg sulfonat de bathofenantrolină în 250 ml de acetat de sodiu 2 M (68,0 acetat de sodiu cristalizat în 250 ml apă) sau B. Se dizolvă 500 mg ortofenantrolină în 250 ml acetat de sodiu 2 M.

Reactivii se pot păstra până la 30 de zile, în sticle brune, la temperatura camerei.

3. **Standard stoc**: se dizolvă 50 mg fier metalic p.a. în 1 ml HCl (d = 1,19) într-o capsulă menținută pe baie de apă, la fierbere; dacă

scade lichidul se mai adaugă HCl cu picătura. După răcire se aduce la 100 ml cu apă bidistilată; 1 ml conține 500 µg fier.

**Standard de lucru:** se diluează standardul stoc 1/250 cu HCl 5 M (o,5 ml HCl, d = 1,19 adus la 1000 ml cu apă distilată). Conține 200 µg fier/100 ml; 1 ml conține 2 µg fier.

**Modul de lucru** se realizează conform schemei de mai jos:

În eprubete de centrifugă se pipetează:

| | **Probă** | **Standard** | **Blanc** |
|---|---|---|---|
| Ser | 2 | - | - |
| Standard | - | 2 | - |
| Apă bidistilată | - | - | 2 |
| Soluție deproteinizantă | 2 | 2 | 2 |
| Se agită energic și după 5 minute se centrifughează.<br>În eprubete de lucru se pipetează: | | | |
| Supernatant ser | 2 | - | - |
| Supernatant standard | - | 2 | - |
| Supernatant blanc | - | - | 2 |
| Bathofenantrolină | 2 | 2 | 2 |

Se amestecă bine și după 5 minute se măsoară extincțiile probelor ($E_P$), standardului ($E_S$) și blancului ($E_B$) față de apă distilată, în cuvă de 1 cm la 535 nm.

**Calcul.** Deoarece standardul conține 200 µg Fe/100 ml, formula de calcul este:

$$\frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \times 200 = \mu g \text{ Fe/100 ml ser}$$

**Observații**

► se utilizează numai apă bidistilată sau demineralizată pe schimbători de ioni, pentru a se elimina interferența cu fierul din apă;

► se păstrează separat un set de sticlărie care se folosește numai pentru determinarea fierului, spălat cu HCl 20% și, în final, cu apă demineralizată;

► recoltarea sângelui se va face prin puncție venoasă, cu un ac de nichel (sau ac inoxidabil nou), lăsând să curgă sângele direct într-o eprubetă uscată de centrifugă. Se lasă să se coaguleze la temperatura camerei. Fără a manipula cheagul, se centrifughează și se pipetează imediat serul limpede;

► probele de ser hemolizate nu se mai folosesc pentru determinarea fierului seric.

Bathofenantrolina fiind practic insolubilă în apă trebuie să se folosească sulfonatul disodic de bathofenantrolină. Este de preferat procurarea reactivului ca atare, deoarece procedeul de sulfonare este foarte laborios.

**Prepararea sulfonatului de bathofenantrolină:** într-o eprubetă mică se cântăresc 110 mg bathofenantrolină și se adaugă 0,6 ml acid clorsulfonic. Se fierbe 30 de secunde pe o flacără foarte mică. Se răcește câteva minute în aer, apoi cu apă de robinet. Se toarnă cu precauție (cu picătura) soluția brună din eprubetă într-un pahar cu 30 ml apă, amestecând continuu cu o baghetă de sticlă. Se spală eprubeta cu încă 20 ml apă, după care se adaugă 50 ml soluție de acetat de sodiu 4 M și se încălzește pe baie de apă la 80-90°C. Se amestecă cu o baghetă până la dizolvarea completă a precipitatului format la început.

Toate operațiile se efectuează cu sticlărie perfect spălată cu apă demineralizată și se utilizează reactivi lipsiți de fier. Soluția finală nu trebuie să aibă nuanță roz.

# V. EXPLORAREA METABOLISMULUI HIDROELECTROLITIC

## V.1. GENERALITĂȚI

Metabolismul hidroelectrolitic deține un rol esențial în menținerea integrității morfofuncționale a organismului și realizării homeostaziei acestuia.

Din totalul elementelor chimice existente, natura a selectat aproximativ 52 de elemente care intră în compoziția materiei vii; dintre acestea numai 40-43 apar în mod constant în orice organism fiind denumite **bioelemente.**

Un număr relativ redus de elemente (circa 25) sunt implicate în mod esențial în structura și funcționalitatea organismelor vii, acestea fiind clasificate în trei categorii:

- elemente **esențiale** dezvoltării lor;
- elemente **posibil esențiale;**
- elemente **neesențiale** sau tolerabile (vezi figura V.1.).

Electroliții, sub formă de ioni (anioni și cationi), din diverse lichide biologice îndeplinesc în organismul uman numeroase funcții vitale:

- sunt constituienți esențiali ai celulelor;
- reglează permeabilitatea membranelor;
- reglează echilibrul acido-bazic al plasmei;
- reglează excitabilitatea neuromusculară;
- intră în compoziția enzimelor, hormonilor.

Cele mai importante elemente pentru organismul uman sunt: **calciul** ($Ca^{2+}$), **magneziul** ($Mg^{2+}$), **zincul** ($Zn^{2+}$), **sodiul** ($Na^{+}$), **potasiul** ($K^{+}$), **fosforul** ($PO_4^{3-}$) sub forma fosfaților, **clorul** ($Cl^{-}$), acestea totalizând aproximativ 80% din conținutul în ioni al organismului uman.

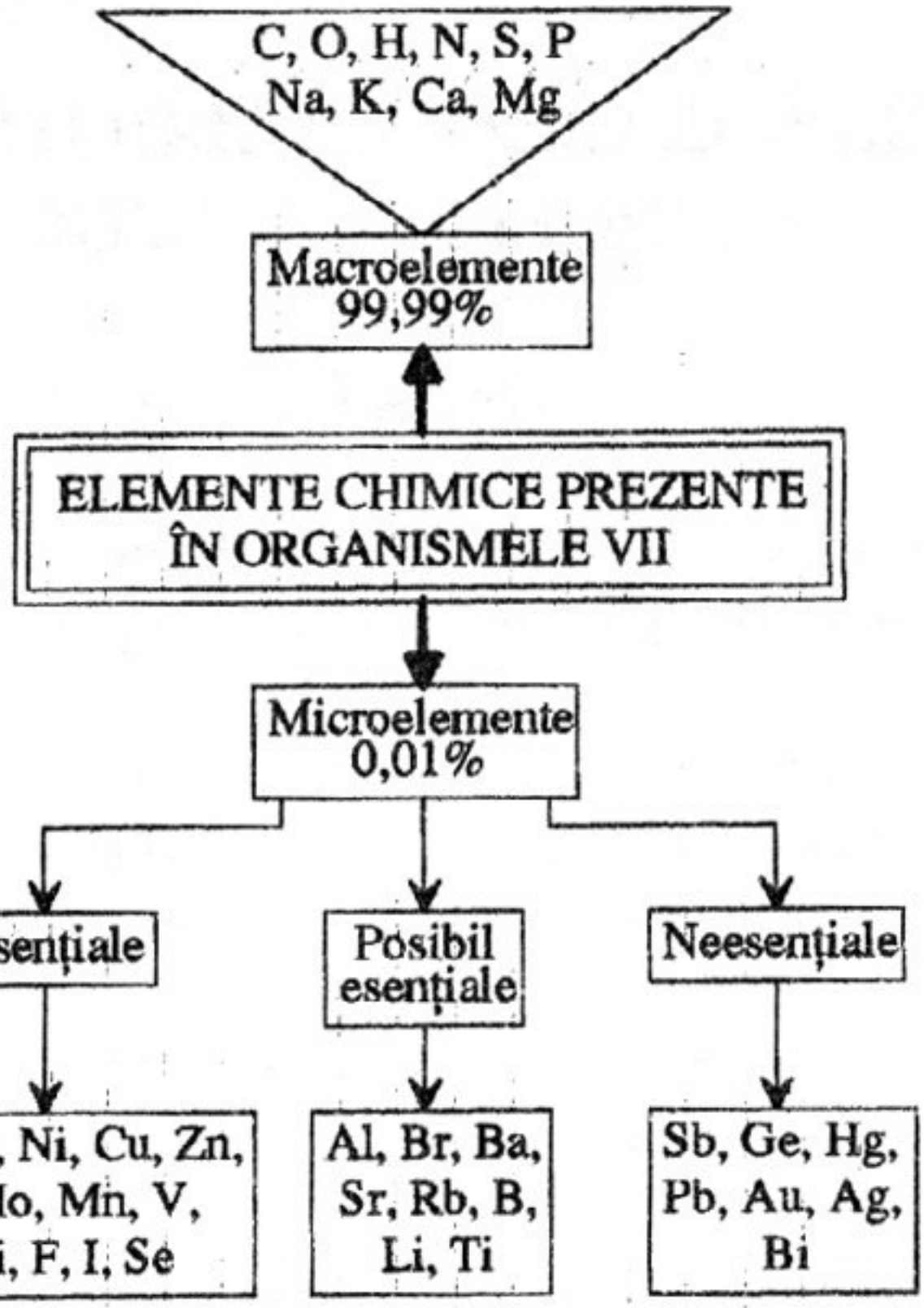



**Fig.V.1. Elemente chimice identificate în organismele vii**

Tabelul V.1. **PRINCIPALELE ROLURI BIOLOGICE ALE UNOR IONI ESENȚIALI**

| Ionul | Roluri biologice esențiale |
|---|---|
| $Ca^{2+}$ | ▪ participă la reglarea permeabilității membranelor;<br>▪ reglator al excitației nervoase;<br>▪ rol plastic deoarece intră în compoziția scheletului și dinților;<br>▪ participă în procesul de coagulare a sângelui;<br>▪ este activator al unor enzime;<br>▪ intervine în metabolismul renal; |
| $Mg^{2+}$ | ▪ are rol de protecție a membranei mitocondriale;<br>▪ intervine în contracția musculară;<br>▪ acționează sinergic cu ionul de calciu asupra excitabilității neuromusculare;<br>▪ acționează ca un activator enzimatic;<br>▪ formează complexe cu ATP-ul; |

| | |
|---|---|
| $Zn^{2+}$ | ▪ este constituient al unor enzime importante: anhidraza carbonică, fosfataza alcalină, arginaza etc.;<br>▪ stimulează sinteza de proteine, acizi grași și implicit influențează creșterea;<br>▪ intervine în procesul de osificare;<br>▪ influențează activitatea unor glande endocrine; |
| $Na^{+}$ | ▪ este ionul metabolismului apei;<br>▪ este baza alcalină a plasmei;<br>▪ intervine în excitabilitatea neuromusculară;<br>▪ intervine în menținerea echilibrului acido-bazic;<br>▪ intervine în dinamica fenomenelor de polarizare și depolarizare ale membranelor celulare; |
| $K^{+}$ | ▪ intervine în procesele de polarizare și depolarizare ale membranei;<br>▪ condiționează excitabilitatea celulară și propagararea influxului nervos;<br>▪ participă la procesul de contracție musculară;<br>▪ este reglatorul excitației cardiace;<br>▪ intră în alcătuirea unor enzime;<br>▪ participă la reglarea presiunii osmotice; |
| $PO_4^{3-}$ | ▪ are rol plastic, deoarece intră în constituția oaselor și membranei celulare;<br>▪ participă în structura unor sisteme tampon;<br>▪ ia parte la menținerea presiunii osmotice;<br>▪ este prezent în majoritatea sistemelor enzimatice;<br>▪ are rol de bază în întreg metabolismul intermediar;<br>▪ este ionul energeticii celulare; |
| $Cl^{-}$ | ▪ este ionul metabolismului apei;<br>▪ participă la reglarea presiunii osmotice;<br>▪ participă la controlul echilibrului acido-bazic și pH-ului sanguin;<br>▪ face parte din compoziția sucului gastric sub formă de HCl. |

Există o serie de alte elemente - **oligoelemente** - cum ar fi: fier (Fe), cupru (Cu), mangan (Mn), cobalt (Co), molibden (Mo), care sunt utilizate de organism în cantități foarte mici. Sunt prezente în organism și o serie de ioni ca: aluminiu ($Al^{3+}$), crom ($Cr^{3+}$), cadmiu ($Cd^{2+}$) ale căror funcții încă nu sunt suficient elucidate.

Electroliții nu pot fi nici sintetizați, nici degradați în organism. În condiții fiziologice, electroliții se află prezenți în concentrații constante în mediul intern, chiar dacă aportul alimentar variază uneori apreciabil. Funcția de excreție a organismului joacă un rol apreciabil în procesul de menținere constantă a concentrației electroliților în mediul intern.

Organismul posedă o serie de mecanisme în vederea menținerii cât mai constante a unor caracteristici ale mediului intern dintre care amintim: a) presiunea osmotică; b) pH-ul; c) conținutul relativ și absolut în ioni; d) conținutul coloidal; d) temperatura.

Tabelul V.2. **AFECȚIUNI ȘI DEREGLĂRI DEPENDENTE DE METALE**

| Element | Afecțiuni în care este implicat | Element | Afecțiuni în care este implicat |
|---|---|---|---|
| Ca | • cataracte; tetanie | Zn | • anemie, cancer, ciroză hepatică, tulburări de creștere |
| Co | • anemie pernicioasă<br>• miocardiopatie | | |
| Cu | • limfoame<br>• infarct miocardic<br>• artrite reumatice<br>• hepatite infecțioase<br>• leucemie, ciroză<br>• boala lui Hodgkin | Cr | • toleranță scăzută la glucoză<br>• neuropatie periferică |
| | | Mn | • dereglarea spermatogenezei, anomalii de schelet |
| Fe | • anemie feriprivă<br>• cloroză<br>• hemosideroză<br>• hemocromatoză | Se | • deces intrauterin al fătului<br>• distrofie musculară |
| | | I | • distrofie endemică tireopată |
| Li | • sindrom maniaco depresiv | F | • fluoroză, carii dentare |
| Mg | • spasmofilie infantilă<br>• boli gastrointestinale | Cd, Pb, Hg, As, Be | • toxici puternici și poluanți majori |
| Na, K | • boala lui Addison, guta | | |

Excesul sau deficitul în ioni metalici din organism explică multe afecțiuni patologice, în timp ce concentrațiile moderate sunt esențiale dezvoltării normale.

În tabelul V.2. sunt prezentate principalele afecțiuni și dereglări dependente de metale.

Concentrația microelementelor în sângele uman, corelată cu alți parametri, este utilizată clinic în scop de diagnostic și tratament. Câteva exemple edificatoare sunt prezentate în tabelul care urmează (tabelul V.3.).

Tabelul V.3. **ROLUL DIAGNOSTIC AL UNOR MICROELEMENTE**

| **Maladie** | **Nivele serice** | |
|---|---|---|
| | **Crescute** | **Scăzute** |
| Infarct miocardic | Cu, Ni, Mn | Zn, Co |
| Ateroscleroză | Cu, Mn, Mo | Zn |
| Hipertensiune | Cu | Zn, Co |
| Ciroză hepatică | Cu | Ni, Zn |
| Boala lui Wilson | - | Cu, Zn |
| Infecții acute | Cu | Zn, Fe |
| Leucemie | Cu | Zn |
| Uremie | - | Ni, Zn |

Între mediul celular și cel interstițial, ca și între spațiul vascular și cel interstițial, există un permanent flux hidroelectrolitic, iar diferiții electroliți nu prezintă importanță din punct de vedere al masei atomice, ci prin numărul de particule pe unitatea de volum (exprimate sub formă de **milimoli**) și prin sarcinile electrice (exprimate sub formă de **miliechivalenți**).

Pentru studiul metabolismului hidroelectrolitic este important ca toți ionii să fie exprimați în unități identice care să țină cont de **sarcina electrică**, de **activitatea osmotică** și de **reactivitatea chimică**.

## V.2. UNITĂȚI DE MĂSURĂ

### A. Osmolul

Atunci când trebuie puse în evidență caracteristicile osmotice ale lichidelor biologice, unitatea de măsură utilizată este **osmolul.**

Presiunea osmotică este forța care determină mișcarea apei între două soluții de concentrații diferite separate de o membrană; ea este proporțională cu diferența de concentrație a particulelor dizolvate în aceste două soluții.

Ceea ce definește forța care mișcă apa printr-o membrană separatoare (presiunea osmotică) este numărul de particule solvite pe unitatea de volum, care pentru moleculele disociabile este egal cu raportul dintre cantitatea și masa lor atomică, iar pentru moleculele nedisociabile cu raportul dintre cantitatea și masa lor moleculară.

Unitatea de măsură a presiunii osmotice este **osmolul,** care reprezintă presiunea osmotică dezvoltată în 1 l apă sau presiunea dezvoltată de un echivalent dintr-o substanță monovalentă.

Osmolul reprezintă deci raportul dintre cantitatea de substanță exprimată în grame/litru și masa ei atomică:

$$\text{Osmolul (OsM)} = \frac{\text{gram/l}}{\text{masa atomică}}$$

În acest fel, 1 mol de substanță ce nu se disociază în ioni (glucoza, ureea, creatinina) reprezintă 1 osmol din acea substanță, în timp ce 1 mol de substanță ce disociază electrolitic reprezintă un număr de osmoli egali cu un număr de particule existente după disociere. Astfel, 1 mol de clorură de sodiu care disociază în ioni de sodiu și clor reprezintă 2 osmoli; un mol de fosfat de sodiu $Na_2HPO_4$ care disociază în $2Na^+$ și $HPO_4^{2-}$ reprezintă 3 osmoli. Rezultă că disocierea în 2 sau 3 particule dublează sau triplează presiunea osmotică.

Cantitățile mici de solviți din lichidele biologice au condiționat utilizarea unor unități de măsură de **1000** de ori mai mici decât osmolul, numite **miliosmoli.**

$$\text{Miliosmolul (mOsM)} = \frac{\text{mg/l}}{\text{masa atomică}}$$

Pentru soluții plurivalente **mOsM = mEq x valența.**

În condiții fiziologice presiunea osmotică a sângelui este egală cu 300-310 mOsM/l.

**B. Miliechivalentul/litru (mEq/l)**

Concentrația celor mai importanți ioni din sânge se exprimă printr-un sistem unitar, drept unitate fiind luat miliechivalentul/litru (Gamble). Un miliechivalent pe litru reprezintă produsul dintre valență și raportul dintre cantitatea de substanță exprimată în milig.ame la litru și masa atomică.

$$\text{mEq/l} = \frac{\text{mg/l}}{\text{masa atomică}} \text{ x valență}$$

De exemplu:

◆ pentru ionul de sodiu ($Na^+$) care are masă atomică 23, iar concentrația sanguină de 326,6 mg/100 ml, vom avea:

- numărul de miligrame la 100 ml se înmulțește cu 10 pentru a afla numărul de miligrame la litru.

$$326,6 \text{ x } 10 = 3266 \text{ mg/l}$$

$$\frac{3266 \text{ mg/l}}{23} \text{ x } 1 = 142 \text{ mEq/l}$$

◆ pentru ionul de clor ($Cl^-$) care are masă atomică 35,5, iar concentrația sanguină de 355 mg/100 ml, vom avea:

- numărul de miligrame la 100 ml se înmulțește cu 10 pentru a afla numărul de miligrame la litru.

$$355 \text{ x } 10 = 3550 \text{ mg/l}$$

$$\frac{3550}{35,5} \times 1 = 100 \text{ mEq/l}$$

◆ pentru ionul de $Ca^{2+}$ care are masă atomică 40, iar concentrația sanguină de 10 mg/100 ml, vom avea:

- numărul de miligrame la 100 ml se înmulțește cu 10 pentru a afla numărul de miligrame la litru.

$$10 \times 10 = 100 \text{ mg/l}$$

$$\frac{100}{40} \times 2 = 5 \text{ mEq/l}$$

◆ pentru **proteine**, capacitatea de a fixa bazele exprimată în mEq/l se obține înmulțindu-se concentrația proteinelor totale în g/100 ml cu 2,43. De exemplu: 6,6 g/ 100 ml x 2,43 = 16 mEq/l.

Exprimarea concentrației substanțelor solvite în raport cu echivalența lor chimică a reieșit din necesitatea de a determina puterea de combinare chimică a ionilor cu scopul de a defini rolul pe care aceste substanțe îl au în fiziologia omului.

Exprimarea în mEq/l a ionilor din soluții este justificată și de faptul că pe această cale se semnalează neutralitatea electrică a acestora.

De remarcat este faptul că, în toate lichidele biologice există un **echilibru perfect** între anioni și cationi, exprimați în miliechivalenți/l. Tabelul V.3. este edificator în acest sens.

Spațiul intracelular diferă semnificativ de cel extracelular din punct de vedere al compoziției electrolitice. Astfel:

► în spațiul **extracelular** principalul cation este **sodiul** ($Na^+$), iar principalul anion este **clorul** ($Cl^-$);

► în spațiul **intracelular** cationul predominant este **potasiul** ($K^+$), iar anionul predominant este **fosfatul** ($HPO_4^{2-}$).

Tabelul V.3. **DISTRIBUȚIA IONILOR ÎN SECTOARELE HIDROELECTROLITICE**

| IONI | mEq/l | | |
|---|---|---|---|
| | **Lichid intracelular** | **Lichid interstițial** | **Plasma sanguină** |
| **CATIONI** | | | |
| Potasiu ($K^+$) | 115 | 5 | 4,4 |
| Sodiu ($Na^+$) | 35 | 144 | 142 |
| Magneziu ($Mg^{2+}$) | 27 | 3 | 3 |
| Calciu ($Ca^{2+}$) | 5 | 2 | 5 |
| **Total** | 182 | 154 | 154,4 |
| **ANIONI** | | | |
| Fosfat ($HPO_4^{2-}$) | 80 | 2 | 2 |
| Proteine | 47 | 0 | 17 |
| Clorură ($Cl^-$) | 25 | 114 | 103 |
| Sulfat. Acizi organici | 20 | 8 | 7 |
| Bicarbonat ($HCO_3^-$) | 10 | 30 | 27 |
| **Total** | 182 | 154 | 155 |

Valoarea totală a concentrației exprimată în mg/100 ml a anionilor și cationilor **nu este echivalentă**, în timp ce exprimarea în mEq/l relevă o echivalență perfectă.

Păstrarea electroneutralității este strict necesară lichidelor biologice și ea se reflectă preponderent cu ocazia sindroamelor de depleție ionică, când ioni cu aceeași sarcină electrică îi înlocuiesc pe cei pierduți, pentru păstrarea echilibrului electric.

În cele ce urmează vom prezenta implicațiile fiziopatologice ale unor ioni și unele metode de dozare a acestora.

# V.3. CLORUL

## *V.3.1. GENERALITĂȚI. ROLURI BIOLOGICE. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE*

Clorul este un constituient normal al țesuturilor și umorilor, fiind principalul anion din lichidele extracelulare și plasma sanguină.

Clorul este de origine exogenă, pătrunzând în organism sub formă de cloruri, în special ca NaCl; absorbția clorului are loc la nivelul intestinului, printr-un mecanism de schimb în care este implicat ionul $HCO_3^-$.

Între diferitele medii cum ar fi: **eritrocit/plasmă, sânge/lichid cefalorahidian, sânge/limfă, sânge/lichid de edem**, repartiția clorului este reglată de legile echilibrului de membramă (Donnan).

Transportul clorului se face sub formă de soluție ionică pe calea circulației porte și limfatice, iar apoi prin circulația generală. În organismul uman clorul îndeplinește următoarele roluri biologice:

- împreună cu sodiul participă la reglarea volumului apei în spațiile inter și intracelulare, contribuind la reglarea presiunii osmotice;
- prin schimbul $Cl^- \rightarrow HCO_3^-$ între plasmă și eritrocite, participă la controlul echilibrului acido-bazic și al pH-ului sanguin;
- face parte din compoziția sucului gastric sub formă de HCl.

Metabolismul clorului este strâns legat de metabolismul sodiului și potasiului. Modificările fiziologice și patologice ale concentrației clorului seric se suprapun peste modificările echilibrului hidric și ale metabolismului electroliților în general.

Rareori modificările metabolismului clorului apar independent de acestea, ca în cazul tendinței la **alcalinitate** sau **aciditate** datorate unor situații fiziologice sau patologice.

Eliminarea digestivă a clorului este lipsită de importanță practică; cea prin sudoare este influențată de activitatea **hormonilor mineralcorticoizi**. Calea renală reprezintă calea majoră de eliminare a clorului și, ceea ce este de remarcat, după **uree,** anionul clor este al doilea constituient principal din punct de vedere cantitativ al urinei.

Valorile normale ale concentrației clorului din diferite medii biologice, dependent de vârstă, sunt prezentate în tabelul V.4.

Tabelul V.4. **VALORILE NORMALE ALE CLORULUI**
(după Radu Mihai Vasile, 1986)

| **Proveniență** | **Vârstă** | **mEq/l** | **mg/100 ml** |
|---|---|---|---|
| Plasmă, ser | nou născut | 95-100 | 339-355 |
| | copii 0-8 ani | 97-109 | 344-386 |
| | copii 8-18 ani | 92-107 | 326-379 |
| | adulți | 95-111 | 339-394 |
| Lichid cefalorahidian | copii | 111-130 | 394-451 |
| | adulți | 120-135 | 425-479 |
| Sudoare | adulți | 8,8-24,4 | 31-87 |
| | | **mmol/d** | **g/24 h** |
| Urină | nou născuți | 0,3-1,4 | 0,04-0,05 |
| | copii 1-2 ani | 14-40 | 0,50-1,42 |
| | adulți | 120-150 | 4,25-8,86 |
| Suc gastric | adulți | 97-165 | 3,44-5,85 |

$mg/100\ ml = mmol/l \times 3545 \cdot 10^{-3}$;
$mmol/l = mg/dl \times 2851 \cdot 10^{-4}$;
$g/24\ h = mmol/d \times 3545 \cdot 10^{-5}$;
$mmol/d = g/24\ h \times 2821 \cdot 10^{-2}$.

Cea mai mare cantitate de clor se elimină prin urină sub formă de NaCl și, într-o mai mică măsură, KCl, $NH_4Cl$ și $MgCl_2$.

Trebuie remarcat de asemenea, faptul că rinichiul participă la menținerea presiunii osmotice a sângelui tot prin controlul excreției de clorură de sodiu.

Aportul de clorură de sodiu prin alimentație, ca și aportul de apă, va influența cantitatea de cloruri eliminate pe cale renală, existând o relație directă între aport și excreție.

Valorile clorului urinar au o deosebită importanță semiotică deoarece ne informează asupra stărilor de retenție clorurată des întâlnită

în patologia internă și, de foarte multe ori, asupra stărilor de clorurare întâlnite în intervenții chirurgicale (pre și post operator).

Tabelul V.5. **VARIAȚIILE PATOLOGICE ALE CLORULUI**

| **Hipocloremii** | **Hipercloremii** |
|---|---|
| ▪ dietă hipoclorurată;<br>▪ vărsături severe și diaree;<br>▪ acidoză respiratorie;<br>▪ insuficiență suprarenală;<br>▪ stenoză pilorică;<br>▪ ocluzie intestinală;<br>▪ diabet zaharat;<br>▪ diabet insipid;<br>▪ diureză masivă după administrare de diuretice | • dietă hipercloruratâ;<br>• leziuni tubulare renale;<br>• alcaloză respiratorie;<br>• șocuri traumatice;<br>• glomerulonefrită difuză;<br>• nefroangioscleroză;<br>• la bolnavii cardiaci tratați cu medicamente acidifiante;<br>• anemii;<br>• retenție de urină |
| **Hipoclorurii** | **Hiperclorurii** |
| ▪ maladii febrile acute;<br>▪ maladii cardiace decompensate;<br>▪ maladii extrarenale cu edem. | • boala lui Addison;<br>• criză postinfecțioasă;<br>• folosirea diureticelor;<br>• poliurii diverse. |

Variațiile patologice ale clorului urinar sunt în general identice cu cele ale clorului plasmatic, prezentând și anumite particularități.

### *V.3.2. METODA MERCURIMETRICĂ (SCHALES-SCHALES)*

**Principiu.** Într-un mediu puternic acid (pH < 3), ionii de clor sunt determinați prin titrare cu azotat mercuric cu care formează clorura mercurică nedisociată. Sfârșitul titrării se evidențiază prin apariția unei culori violete, datorită prezenței **difenilcarbazonei** ca indicator care reacționează cu excesul de ioni mercurici. Reacția care are loc este următoarea:

$$Hg(NO_3)_2 + 2NaCl \rightarrow HgCl_2 + 2NaNO_3$$

Metoda este simplă, expeditivă și nu necesită deproteinizare.

**Reactivi.**

1. Soluție de azotat mercuric, $Hg(NO_3)_2$, 0,01 N. Se dizolvă 1,083 g oxid roșu de mercur (HgO) în 11 ml $HNO_3$ concentrat; se completează apoi la 1000 ml cu apă bidistilată. Soluția este stabilă indefinit. Soluția se mai poate prepara și din azotat mercuric, $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$, din care se dizolvă 1,6 g în 10 ml $HNO_3$ și circa 700 ml $H_2O$, după aceea se aduce volumul la 1000 ml.

2. Soluție difenilcarbazonă 0,02 N. 500 g difenilcarbazonă se dizolvă în alcool etilic 96% și se aduce volumul la 1000 ml cu alcool etilic. Se păstrează la frigider în flacoane de culoare brună.

3. Soluție standard de NaCl 0,1 N. Se dizolvă în apă bidistilată 5,85 g NaCl, se adaugă 1 ml $CHCl_3$ și se completează volumul la 1000 ml cu apă bidistilată.

**Tehnica de lucru.**

În două pahare Erlenmeyer de 25 ml se introduc:

| Reactivi | Proba | Standard |
|---|---|---|
| Apă bidistilată | 2,5 | 2,5 |
| Ser | 0,1 | - |
| Soluție standard | - | 0,1 |
| Difenilcarbazonă | 5 pic. | 5 pic. |
| Titrare cu $Hg(NO_3)_2$ | $V_P$ | $V_S$ |

Soluțiile se titrează până la apariția unei colorații violete.

**Calcul.**

$$\text{mEq } Cl^-/l = \frac{V_P}{V_S} \text{ x } 100$$

$$\text{mg } Cl^-/100 \text{ ml ser} = \frac{V_P}{V_S} \text{ x } 355$$

$$\text{mg NaCl/100 ml ser} = \frac{V_P}{V_S} \text{ x } 584,5$$

**Observații.**

În cazul serurilor puternic icterice se efectuează deproteinizarea (1 ml ser + 7 ml apă bidistilată + 1 ml $Na_2WO_4$ 10% + 1 ml $H_2SO_4$ 0,66 N). După deproteinizare se centrifughează și se dozează clorul în supernatant. După deproteinizare culoarea indicatorului virează spre albastru.

Determinările trebuie efectuate în cursul primelor două ore de la recoltare. Atât pentru prepararea reactivilor, cât și pentru spălarea sticlăriei se folosește apă bidistilată.

### *V.3.3. METODA ARGENTOMETRICĂ (MOHR)*

**Principiu.** Ionii de clor din lichidele biologice (ser, urină, LCR), se titrează cu o soluție de azotat de argint, în prezența cromatului de potasiu ca indicator. Formarea cromatului de argint de culoare roșie portocalie indică sfârșitul reacției. Reacțiile care au loc sunt următoarele:

$$NaCl + AgNO_3 \rightarrow AgCl + NaNO_3$$

$$AgNO_3 + K_2CrO_4 \rightarrow Ag_2CrO_4 + 2KNO_3$$

**Reactivi.**

1. Soluție $AgNO_3$ n/50;
2. Soluție $K_2CrO_4$ 5%;
3. Alcool etilic.

**Tehnica de lucru.**

**A. Pentru ser și plasmă**

a) Deproteinizarea: într-o eprubetă se pipetează 1 ml ser, 9 ml alcool etilic; se lasă în repaus 10 minute și apoi se filtrează.

b) Dozarea: într-un pahar de titrare de 50-100 ml se introduc 5 ml filtrat, se adaugă 2-3 picături de $K_2CrO_4$ 5%. Se titrează cu $AgNO_3$ n/50 până la apariția unui precipitat roșu cărămiziu.

**Calcul.** În calcul se ține seama că 1 ml $AgNO_3$ n/50 corespunde la 0,00117 g NaCl.

g NaCl/100 ml = V x 0,00117 x 100

Se fac calculele de rigoare pentru a transforma g NaCl în mg Cl/100 ml și mEq/l

**B. Dozarea clorului urinar**

Într-un pahar de titrare se pipetează 1 ml urină, 10 ml apă distilată și 5-6 picături de $K_2CrO_4$ 5%. Se titrează cu soluție de $AgNO_3$ n/50 până la apariția precipitatului portocaliu de $Ag_2CrO_4$.

Se notează cu V volumul de soluție $AgNO_3$ n/50 folosit la titrare.

**Calcul.**

g NaCl/l = V x 0,00117 x 1000

Dacă volumul urinar este cunoscut se poate exprima la volumul de 24 h, după care g NaOH se pot transforma în mEq $Cl^-$/l și mg $Cl^-$/100 ml.

## V.4. CALCIUL

### *V.4.1. GENERALITĂȚI. ROLURI FIZIOLOGICE. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE*

Calciul reprezintă **2%** din masa corpului; **99%** din calciu se găsește în schelet, iar restul în țesuturile moi și sânge. Absorbția calciului alimentar se face, în special, la nivelul intestinului subțire și depinde de cantitatea introdusă și de gradul reabsorbției. La administrarea sărurilor solubile de calciu (anorganice sau organice) resorbția este practic totală. În privința calciului alimentar, absorbția este favorizată de mediul acid (care ajută la solubilizarea sărurilor de calciu), de prezența vitaminelor D și de hormonii cortico-suprarenali.

În organismul uman, calciul exercită roluri biologice importante:

- rol **plastic** prin combinațiile sale insolubile care intră în compoziția scheletului: $Ca_3(PO_4)_2$, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$;
- participă în procesul de coagulare a sângelui;

◆ este activator al unor enzime (lipaza, fosfataza alcalină, adenilatciclaza, fosfodiesteraza, ATP-aza musculară);

◆ are efecte asupra reglării excitabilității neuromusculare în raport de sinergism și antagonism cu alți ioni (relația lui Szent-Gyorgyi):

$$\frac{[PO_4^{3-}][K^+][HC(}{[Ca^{2+}][Mg^{2+}][I}$$

◆ ia parte la menținerea stării coloidale a citosolului;

◆ are rol de al doilea mesager în mecanismul de acțiune a hormonilor;

◆ influențează permeabilitatea membranelor celulare;

◆ rol în transmiterea impulsurilor nervoase;

◆ intervine în metabolismul renal (excesul de calciu induce o scădere a capacității de concentrare renală).

Tabelul V.6. **COMPUȘI CU CALCIU DIN ORGANISMUL UMAN**

| Denumire | Compoziție | Localizare |
|---|---|---|
| • carbonat de calciu | $CaCO_3$ | ▪ vase de sânge, salivă |
| • carbonat acid de calciu | $Ca(HCO_3)_2$ | ▪ vase de sânge, salivă |
| • clorură de calciu | $CaCl_2$ | ▪ lichide extracelulare |
| • fluorură de calciu | $CaF_2$ | ▪ smalțul dinților |
| • fosfat de calciu | $Ca_3(PO_4)_2$ | ▪ oase |
| • hidroxiapatita | $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ | ▪ oase |
| • citrat de calciu | $C_6H_6O_7Ca$ | ▪ lapte |
| • caseinat de calciu | - | ▪ lapte |

În tabelul V.7. sunt consemnate valorile normale ale calciului în diferite medii biologice (după Radu Mihai Vasile, 1986).

Calciul plasmatic este constituit din două fracțiuni distincte din punct de vedere chimic și biologic:

► **calciul difuzabil sau ultrafiltrabil** format din:

• ioni de calciu liberi (calciu ionizat) - 45%;

• ioni de calciu legați de molecule mici, cum ar fi acidul citric (calciu neionizat) - 5%.

Tabelul V.7. **VALORILE NORMALE ALE CALCIULUI**

| **Proveniența** | **Vârsta** | **Forma** | **mEq/l** | **mg/100 ml** |
|---|---|---|---|---|
| Ser | copii 0-7 ani | total | 4,50 | 9 |
| | copii 7-14 ani | total | 4,50-5,50 | 9-11 |
| | | ionic | 2,12-2,88 | 4,25-5,75 |
| | adulți | total | 4,50-5,50 | 9-11 |
| | | ionic | 2,14-3,16 | 4,3-6,3 |
| Lichid cefalorahidian | adulți | total | 2,04-2,94 | 4,1-6,3 |
| | | | **mEq/l** | **mg/24 h** |
| Urină | copii 7-14 ani | total | 5,50-7,00 | 110-140 |
| | adulți | total | 5,00-15,00 | 100-300 |

$$mg/100\ ml = mEq/l \times 20004 \cdot 10^{-3}$$
$$mEq/l = mg/100\ ml \times 4990 \cdot 10^{-4}$$
$$mg/24\ h = mEq/d \times 4008 \cdot 10^{-2}$$
$$mEq/l = mg/24\ h \times 2495 \cdot 10^{-5}$$

Această fracțiune reprezintă 50% din calciul plasmatic total și sub această formă își exercită funcțiile sale specifice.

**Calciul ionizat** reprezintă fracțiunea de care depinde **excitabilitatea neuromusculară.** MacLean și Hastings au propus o nomogramă pentru calculul concentrației calciului ionizat. Pe baza acestei nomograme, **Zeissler** a elaborat următoarea formulă de calcul:

$$mg\ calciu\ ionizat/100\ ml\ ser = \frac{6 \cdot Ca - \frac{P}{3}}{6 + P}$$

Ca = calciu total în mg/100 ml; P = proteinemia în g/100 ml.

Valori normale: 4,2-5,2 mg/100 ml; 2,1-2,6 mEq/l.

► **calciu nedifuzabil**, care constă din ioni de calciu fixați mai mult sau mai puțin labil de proteinele plasmatice, în special de albumine (50%).

Între fracțiunile de calciu difuzabil și nedifuzabil există un echilibru dinamic, cu mențiunea că, în general, calciul difuzabil este cel mai susceptibil de a suferi modificări cantitative, fiind angrenat în activitatea biologică.

Transportul intracelular al calciului ionic este îndeplinit de o serie de proteine specifice, dintre care cea mai importantă este **calmodulina.** Calmodulina este o proteină formată dintr-un singur lanț polipeptidic alcătuit din 141 aminoacizi cu o masă moleculară de 16800 și care are capacitatea specifică de a lega labil 4 ioni de calciu pe care-i acceptă cu ușurință și-i cedează în diferitele compartimente celulare unde i se în general, calciul este în echilibru antagonic cu fosforul sanguin; scăderea calciului sanguin induce creșterea fosforului sanguin și invers.

Eliminarea de calciu are loc în mod predominant pe cale renală, numai o mică proporție fiind eliminată pe cale digestivă.

Tabelul V.8. **VARIAȚIILE PATOLOGICE ALE CALCIULUI**

| **Hipocalcemii** | **Hipercalcemii** |
|---|---|
| • hipoparatiroidism;<br>• hipovitaminoză D;<br>• tetanie, rahitism;<br>• osteomalacie;<br>• insuficiență renală cronică; | ▪ hiperparatiroidism;<br>▪ hipervitaminoză D;<br>▪ reumatism;<br>▪ catabolism osos activ în tumori maligne;<br>▪ hipercalcemia idiopatică a copilului;<br>▪ scleroză, gută |
| **Hipocalciurii** | **Hipercalciurii** |
| • boli acute febrile;<br>• reumatism;<br>• insuficiență paratiroidiana;<br>• tetania paratireoprivă. | ▪ hiperparatiroidism;<br>▪ acidoze. |

cere prezența.

În menținerea constantă a nivelului calciului, intervin mai mulți factori:

- activitatea hormonilor paratiroidieni și estrogeni, androgeni, tiroidieni;
- echilibrul între țesutul osos și lichidul extracelular;
- intervenția vitaminelor D, în special în reglarea raportului Ca/P;
- gradul de absorbție, condiționat de cantitatea și tipul alimentelor ingerate;
- homeostazia eliminării calciului (în special pe cale renală);
- raportul de sinergism și antagonism al calciului cu alți ioni, conform relației lui Szent-Gyorgyi.

Calciul excretat în urină rezultă din cantitatea filtrată glomerular din care tubii extrag aproximativ de 99%. Numai calciul ionic difuzibil poate fi eliminat renal. Excreția urinară a calciului este controlată de hormonul paratiroidian prin **mobilizarea** absorbției calciului din intestin. Trebuie precizat faptul că alcalinitatea urinei favorizează precipitarea sărurilor de calciu și formarea calculilor renali.

### *V.4.2. METODE DE DOZARE A CALCIULUI*

Calciul seric și urinar se dozează cu următoarele metode:

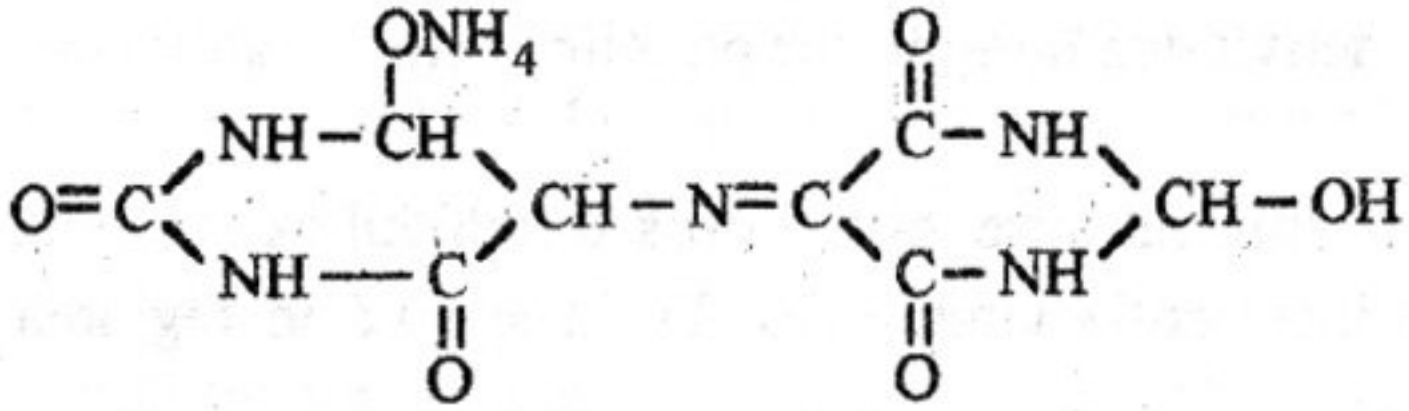
- metoda complexonometrică (Elliot);
- metoda flamfotometrică;
- metoda spectrofotometrică de absorbție atomică;
- metoda colorimetrică.

#### *V.4.2.1. METODA ELLIOT*

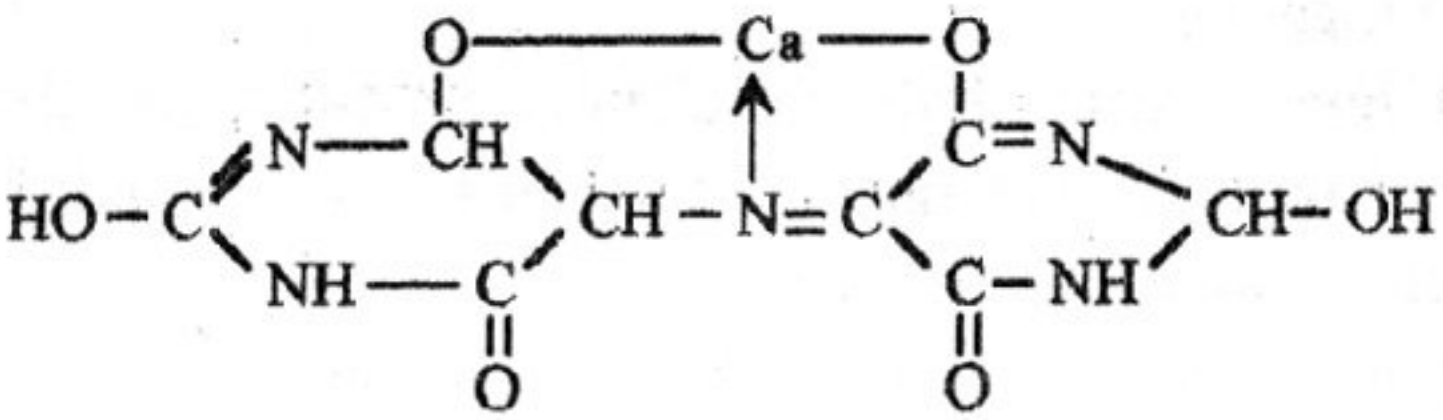
**Principiul metodei.**

Într-un mediu puternic alcalin (pH > 12,5), calciul din ser sau urină reacționează cu un indicator complexometric denumit **murexid** (M) cu care formează o combinație complexă de culoare roșie violetă.

$$Ca^{2+} + \text{Murexid} \rightleftarrows \text{Ca–Murexid}$$



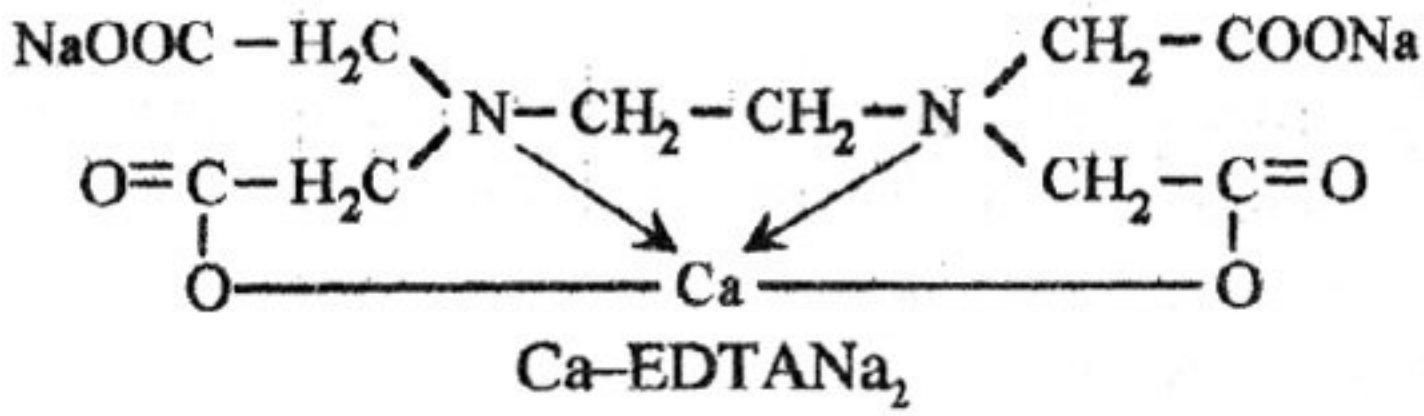
Murexid (sarea de amoniu a acidului purpuric) - violet



Ca–Murexid - roşu purpuriu

Prin titrare cu soluție de $EDTANa_2$ (sarea de sodiu a acidului etilendiaminotetraacetic), murexidul este decomplexat, iar $EDTANa_2$ reacționează cu ionii de calciu formând complexonatul Ca–$EDTANa_2$.

Ca–Murexid + $EDTANa_2$ $\xrightarrow[\text{violet}]{}$ Ca–EDTA $Na_2$ + Murexid



Ca–$EDTANa_2$

Sfârșitul reacției este indicat prin virarea culorii indicatorului de la **roșu purpuriu** (Ca–Murexid) la **violet,** culoarea caracteristică murexidului liber.

De asemenea, complexul Ca–$EDTANa_2$ se caracterizează printr-o stabilitate mai mare decât complexul Ca–Murexid.

**Reactivi,**

1. Soluția de $EDTA \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$ 0,01 N (se cântăresc 1,861 g $EDTA \cdot Na_2$, se introduc într-un balon cotat de 1000 ml și se aduce la semn cu apă distilată).

2. Soluție NaOH 9 N (36 g NaOH se aduc la 100 ml cu apă distilată).

3. Soluție de murexid 1% în apă distilată.

4. Soluție stoc etalon de calciu (A). Într-o eprubetă se introduc: $CaCO_3$ 2 g + 1 ml HCl concentrat.

Capsula se încălzește pe baie de apă cu multă atenție până ce conținutul este adus la sec; reziduul care conține $CaCl_2$ se dizolvă în apă, se trece cantitativ într-un balon cotat și se aduce la 1000 ml cu apă distilată.

1 ml din această soluție conține 0,8 mg Ca.

$M_{CaCO_3} = 100$; $A_{Ca} = 40$

rezultă că 100 g $CaCO_3$ ——— 40 g Ca

2 g $CaCO_3$ ——— x g Ca

x = 0,8 g

Dar 0,8 g Ca ——— se găsesc în 1000 ml

Deci 0,8 mg Ca ——— 1 ml

5. Soluție etalon de calciu (B): se diluează soluția etalon (A) în raportul 1/10. Deci soluția etalon de calciu va conține 0,08 mg Ca/ml.

**Tehnica de lucru.**

În 3 pahare Erlenmeyer de 250 ml se introduc:

| Soluție | Probă | Blanc | Etalon |
|---|---|---|---|
| Ser, urină | 2 | - | - |
| Apă distilată | 50 | 52 | 47 |
| Etalon (B) | - | - | 5 |
| NaOH 9 N | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Murexid 1% | 3-5 pic | 3-5 pic | 3-5 pic |
| Titrare cu EDTA 0,01 N | n ml | n ml | n ml |

pic = picătură

**Observații:**

- dacă reactivii și, în special apa, nu conțin ioni de calciu, blancul se colorează de la început în violet, deci n = 0;
- soluția de $EDTANa_2$ se păstrează câteva luni în flacon de polietilenă, etalonarea fiind obligatorie la fiecare lot de probe;

◆ standardul stoc de calciu se păstrează în flacoane de polietilenă și se diluează la întrebuințare;

◆ pentru aflarea rezultatelor în mEq/l, rezultatul în mg/100 ml se înmulțește cu 0,5.

**Calcul.**

**I. Determinarea factorului în calciu al soluției de $EDTANa_2$.**

1 ml $CaCl_2$ conține ——————— 0,08 mg Ca

5 ml $CaCl_2$ conține ——————— 0,40 mg Ca

Dacă la titrare s-au utilizat (N-n) ml de $EDTANa_2$ (N = ml $EDTANa_2$ folosiți pentru titrarea etalonului; n = ml $EDTANa_2$ pentru titrarea blancului de reactivi), atunci:

(N-n) ml $EDTANa_2$ corespund ——————— 0,4 mg Ca

1 ml $EDTANa_2$ corespund ——————— x mg Ca

$$x = \frac{1 \cdot 0,4}{(N - n)} = a \text{ mg Ca}$$

Deci 1 ml EDTA reacționează cu a mg Ca

**II. Dozarea calciului seric și urinar.**

Relația ce se aplică este următoarea:

mg Ca% = $(n' - n) \cdot a \cdot 50$

50 = cifră de exprimare a rezultatului la 100 ml ser/urină, care provine din următorul raționament:

2 ml ser/urină ——————— $(n' - n) \cdot a$ mg Ca

100 ml ser/urină ——————— x

x mg Ca% = $100/2 \cdot (n' - n) \cdot a = (n' - n) \cdot a \cdot 50$

### *V.4.2.2. METODA FLAMFOTOMETRICĂ*

Metoda se utilizează pentru dozarea concomitentă a ionilor de $Na^+$, $K^+$, $Ca^{2+}$.

**Principiu.**

Serul sau plasma sanguină se diluează cu apă distilată și se pulverizează cu ajutorul unui curent de aer. Aerosolii produși se amestecă cu un gaz carburant (acetilenă, aer) și se ard într-un bec

special, luând naștere spectrele de emisie caracteristice fiecărui element. Concentrația ionilor cercetați este proporțională cu fluxul luminos, a cărui intensitate se determină prin măsurarea curentului fotoelectric pe care-l declanșează și care este măsurat prin deflexiunile unui galvanometru montat în circuitul celulei fotoelectrice.

A. **Pregătirea probelor** pentru analizarea probelor de ser sau plasmă sanguină, fără hemoliză. Dacă determinarea nu se poate efectua în aceeași zi, se decantează serurile și se păstrează la frigider până în ziua următoare. Centrifugarea probelor de sânge se va face timp de 10 minute la 5000-6000 rotații pe minut. Diluarea serului sau plasmei în vederea determinărilor se va face în felul următor:

a) **Pentru sodiu.** Se introduce în balon cotat de 100 ml, 1 ml ser sau plasmă sanguină și se aduce la semn cu apă distilată. Se amestecă prin răsturnare de 10-15 ori. Se pot utiliza și 0,1 ml ser (micropipetă) și 9,9 apă distilată, amestecând prin răsturnare de 10-15 ori, utilizând un dop de cauciuc.

b) **Pentru potasiu și calciu.** Se diluează 1 ml ser cu 19 ml apă distilată și se amestecă ca mai sus (respectiv 0,4 ml ser + 7,6 ml apă). Probele astfel pregătite se pun în capace de cutii Petri cu diametrul de 8 cm și se introduc în pulverizatorul aparatului pentru a fi măsurate.

B. **Pregătirea soluțiilor etalon**

1. **Pentru sodiu:**

**Soluția stoc:** se dizolvă în apă distilată, în balon cotat de 1000 ml, 2,54181 g NaOH cristalizat p.a. și se aduce la semn cu apă bidistilată. Din această soluție stoc se fac trei etaloane de lucru:

**Etalonul 1:** 2,5 ml soluție stoc se diluează cu apă distilată la 100 ml, în balon cotat. Această soluție corespunde concentrației de **250 mg sodiu la 100 ml;**

**Etalonul 2:** 3 ml soluție stoc se aduc ca mai sus la 100 ml. Corespunde la concentrația de **300 mg sodiu la 100 ml.**

**Etalonul 3:** 3,5 ml soluție stoc se aduc la 100 ml ca mai sus. Corespunde la concentrația de **350 mg sodiu la 100 ml.**

2. **Pentru potasiu:**

**Soluția stoc:** se dizolvă în 1000 ml apă bidistilată, în balon cotat, 0,9551 g KCl p.a. **1 ml soluție conține 0,5 mg K.**

**Soluție electroliți:** se dizolvă în 1000 ml apă bidistilată, în balon cotat, 1,3875 g clorură de calciu cristalizat p.a. și 41,96 g NaCl cristalizat p.a. Din soluția stoc se fac trei etaloane de lucru:

**Etalonul 1:** 1 ml soluție stoc = 1 ml soluție electroliți, se aduce la 100 ml cu apă distilată, în balon cotat. Corespunde la concentrația de **10 mg K la 100 ml.**

**Etalonul 2:** 2 ml soluție stoc + 1 ml soluție electroliți, se aduce la 100 ml cu apă distilată, în balon cotat. Corespunde la concentrația de **20 mg K la 100 ml.**

**Etalonul 1:** 3 ml soluție stoc + 1 ml soluție electroliți, se aduce la 100 ml cu apă distilată, în balon cotat. Corespunde la concentrația de **30 mg K la 100 ml.**

Aceste etaloane se utilizează ca atare la trasarea curbelor.

3. **Pentru calciu:**

**Soluție stoc 1:** se dizolvă în balon cotat de 1000 ml, 0,125 g carbonat de calciu anhidru p.a. 50 ml HCl d = 1,19, 7,880 g NaCl cristalizat p.a. și 0,360 g KCl cristalizat p.a. și se aduce la semn cu apă bidistilată. Din această soluție se prepară soluția de lucru diluând cu apă distilată 1/20. Soluția de lucru corespunde la concentrația de 5 mg $Ca^{2+}$ la 100 ml.

**Soluția stoc 2:** se dizolvă în 1000 ml apă bidistilată ca mai sus, 0,250 g carbonat de calciu, 50 ml HCl d = 1,19, 7,880 g NaCl și 0,360 g KCl. Din această soluție se prepară soluția de lucru diluând cu apă distilată în proporție de 1/20. Corespunde la concentrația de 10 mg $Ca^{2+}$ la 100 ml.

**Soluția stoc 3:** se dizolvă în 1000 ml apă bidistilată ca mai sus, 0,375 g carbonat de calciu, 50 ml HCl d = 1,19, 7,880 g NaCl și 0,360 g KCl. Soluția de lucru se diluează 1/20. Corespunde la

concentrația de 15 mg $Ca^{2+}$ la 100 ml. Soluția stoc și etaloanele de lucru se păstrează la temperatura laboratorului în baloane cotate.

### *V.4.2.3. METODA COLORIMETRICĂ*

**Principiul metodei.** Calciul din lichidele biologice se combină cu o-cresolftaleină la pH = 10,5-11 formând un complex colorat în roșu-violaceu. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația în proba respectivă.

**Reactivi:**

1. Reactiv de culoare: soluție apoasă de o-cresolftaleină 0,8%;

2. Reactiv de legare a magneziului: o-hidroxiquinolină (0,075 g/tabletă);

3. Tampon monoetanolamină - borat 14,8 N.

Într-un pahar Berzelius se aduce o tabletă de reactiv (2) și se mărunțește cu o baghetă. Se adaugă 1,5 ml alcool etilic apoi 5 ml din reactivul (3) și 5 ml din reactivul (1). Se adaugă 25 ml de apă bidistilată, apoi se aduce conținutul într-un cilindru gradat, completându-se la 100 ml cu apă bidistilată. Se adaugă 1 ml HCl concentrat (la nișă). Se omogenizează și se lasă 1 h la temperatura camerei.

Nu se păstrează de pe o zi pe alta.

4. Standard de calciu stoc - 100 mg/100 ml;

5. Standard de lucru 10 mg/100 ml preparat prin diluarea soluției stoc cu NaCl 0,9%. Se poate păstra o săptămână la frigider.

**Tehnica de lucru**

Se lucrează după următoarea schemă:

| | **Probă** | **Standard 1** | **Standard 2** | **Martor** |
|---|---|---|---|---|
| Plasmă (urină diluată 1:10) | 0,1 | - | - | - |
| Standard de lucru | - | 0,1 | 0,1 | - |
| Apă bidistilată | - | - | - | 0,1 |
| Reactiv de lucru | 6 | 6 | 6 | 6 |

Se agită pentru o omogenizare foarte bună. Se citesc extincțiile imediat la $\lambda = 570$ nm.

**Calcul**

$$\text{mg Ca/100 ml plasmă} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \times 10$$

$$\text{mg Ca/100 ml plasmă} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \times 10 \times D$$

D = diluția probei de urină.

**Observații**

- pentru diluția urinei se folosește ser fiziologic;
- toate vasele trebuie să fie spălate foarte bine, clătite cu HCl 3 N și reclătite cu apă bidiastilată;
- recoltarea plasmei se face numai pe heparină.

## V.5. FOSFORUL

### *V.5.1. GENERALITĂȚI. ROLURI BIOLOGICE*

Fosforul este unul dintre constituienții principali ai organismului uman. În organismul uman se găsesc 600-800 g fosfor, din care aproximativ 87% în schelet, iar restul în alte țesuturi și lichide extracelulare. În schelet, fosforul se găsește sub formă de fosfat tricalcic și hidroxiapatită. Alte forme de fosfor existente în țesuturi și lichidele biologice din organism sunt: fosfați anorganici, fosfolipide, nucleoproteine, esteri fosforici, mai ales cu hexozele etc.

În plasmă, fosforul se găsește în mai multe combinații:

- sub formă de ioni fosforici (70%) - din care $HPO_4^{2-}$ (fosfați bibazici) 80% și $H_2PO_4^-$ (fosfați monobazici) 20% cu Na, K, Ca, Mg;
- fosfolipide - 10%;
- fosfor proteic - 15%;
- esteri fosforici și alți compuși fosforilați - 5%.

În general, fosforul este întâlnit sub formă de radical fosforic și nu de fosfor elementar. Fosforul este absorbit la nivelul intestinului

subțire ca fosfor anorganic după scindarea compușilor organici din alimente de către enzimele pancreatice și intestinale.

Fosforul îndeplinește în organismul uman funcții biologice multiple, toate de cea mai mare însemnătate și anume:

- **rol plastic** - intră în constituția oaselor și a fosfolipidelor din membrana celulară;
- participă în structura unor diverse **sisteme tampon;**
- ia parte la **menținerea presiunii osmotice;**
- are un rol de bază în întreg metabolismul intermediar, precum și în numeroase reacții biochimice sub formă de compuși **macroergici;**
- este prezent în unele sisteme enzimatice.

În concluzie, se poate afirma că nu există nici o funcție importantă a organismului în care fosforul să nu participe.

### *V.5.2. VALORI NORMALE. VARIAȚII PATOLOGICE*

În laboratoarele de biochimie clinică se practică mai ales dozarea fosforului anorganic în ser, deoarece concentrația sa este un indicator util al:

- metabolismului osos;
- funcției paratiroidei;
- funcției renale.

În tabelul V.9. sunt consemnate valorile normale ale fosfatului anorganic din diferite lichide biologice (după Radu Mihai Vasile, 1986).

Concentrația fosfaților anorganici din ser variază în funcție de vârstă, așa cum reiese din tabelul de mai sus (V.9.).

Eliminarea pe cale renală reprezintă 2/3 din excreția totală de fosfor. Fosforul este excretat în urină sub forma anionilor $H_2PO_4^-$ și $HPO_4^{2-}$ în combinație cu $Na^+$, $K^+$ și, mai puțin, cu $NH_4^+$, $Mg^{2+}$ și $Ca^{2+}$. Anionii fosforici provin fie din fosfații minerali de origine alimentară, fie prin degradarea compușilor fosforilați cu importanță biologică (fosfolipide, acizi nucleici, fosfoproteine) endogeni sau exogeni. În

urină se mai găsesc și esteri fosforici care reprezintă totuși o cantitate nesemnificativă (1-4%) din excreția totală de fosfor.

Tabelul V.9. **VALORILE NORMALE ALE FOSFORULUI ANORGANIC**

| Proveniența | Vârsta | mmol/l | mg/100 ml | mEq/l |
|---|---|---|---|---|
| Ser | sugari | 1,3-2,3 | 4,0-7,0 | 2,32-4,06 |
| | copii 1-14 ani | 1,1-1,8 | 3,5-5,5 | 2,03-3,19 |
| | adulți | 0,65-1,61 | 2,0-5,0 | 1,16-2,90 |
| Lichid cefalorahidian | copii 1-14 ani | 0,48-0,97 | 1,5-3,0 | 0,87-1,74 |
| | adulți | 0,42-0,48 | 1,3-1,5 | 0,75-0,87 |
| | | **mmol/100 ml** | **g/24 h** | |
| Urină | copii 4-8 ani | 19,37-25,83 | 0,6-0,8 | |
| | copii 9-12 ani | 25,83-32,29 | 0,8-1,0 | |
| | adulți | 22,60-78,43 | 0,7-1,5 | |

mmol/l = mg/100 ml x $3229 \cdot 10^{-4}$;
mg/100 ml = mmol/l x $3097 \cdot 10^{-3}$;
mEq/l = mg/100 ml x $5800 \cdot 10^{-4}$;
mmol/d = g/24 h x $3229 \cdot 10^{-2}$;
g/24 h = mmol/d x $3097 \cdot 10^{-5}$.

Raportul dintre $HPO_4^{2-}$ și $H_2PO_4^-$ variază în urină într-o strânsă legătură cu starea de funcționare a mecanismelor de reglare a echilibrului acido-bazic și în același timp cu procesele de eliminare și reabsorbție a fosfaților care sunt reglate hormonal.

Variațiile patologice ale fosforului sunt strâns legate de acelea ale calciului, așa încât se va discuta despre metabolismul fosfo-calcic, care poate fi perturbat datorită următoarelor cauze:

I. Tulburarea aportului alimentar de fosfor și calciu.
II. Tulburări de absorbție intestinală a fosforului și calciului.
III. Tulburări de utilizare a fosforului și calciului.
IV. Tulburări de eliminare a fosforului și calciului.

Tabelul V.10. **VARIAȚIILE PATOLOGICE ALE FOSFORULUI**

| **Hipofosfatemii** | **Hiperfosfatemii** |
|---|---|
| • osteomalacie;<br>• rahitism;<br>• hiperparatiroidism;<br>• sindromul lui Burnett; | • insuficiență renală;<br>• hipervitaminoza D;<br>• hipoparatiroidism;<br>• comă diabetică; |
| **Hipofosfaturii** | **Hiperfosfaturii** |
| • nefrite sclerogene cu acidoză. | • acidoză diabetică;<br>• anemia saturniană;<br>• osteomalacii;<br>• osteoporoze;<br>• hiperparatiroidism;<br>• rahitism;<br>• cancer, epilepsie;<br>• tuberculoză în faza inițială. |

### *V.5.3. DOZAREA FOSFORULUI SERIC. METODA BRIGGS*

**Principiul metodei.**

Fosforul anorganic, rezultat după deproteinizarea materialului biologic, sub forma ionului ortofosfat este dozat colorimetric după reducerea fosfomolibdatului de amoniu care se formează în exces de molibdat de amoniu și în mediu acid. Reacția de formare a fosfomolibdatului de amoniu:

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 21HNO_3 =$$

$$= (NH_4)_3H_4P(Mo_2O_7)_6 + 21\ NH_4NO_3 + 10H_2O$$

Complexul de fosfomolibdat de amoniu este redus, în mediu acid, cu un agent reducător format din hidrochinonă - sulfit de sodiu la albastru de molibden, care se prezintă sub forma unei soluții de culoare albastră a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de fosfor din proba de cercetat.

**Reactivi.**

1. Acid tricloracetic 10%;

2. Soluție acidă de molibdat de amoniu: 25 g molibdat de amoniu sunt dizolvate în 300 ml apă bidistilată. Se adaugă 75 ml $H_2SO_4$ concentrat. După răcire se completează volumul cu apă bidistilată la 500 ml;

3. Soluție de hidrochinonă 1% în apă bidistilată. Se prepară extemporaneu și se conservă cu o picătură de acid sulfuric concentrat.;

4. Sulfit de sodiu (anhidru) 20%;

5. Soluție standard de fosfor: 0,439 g fosfat monopotasic ($KH_2PO_4$ Sörensen), uscat în exicator, se dizolvă în 1000 ml apă bidistilată. 1 ml din această soluție conține 0,1 mg P. Se conservă în prezență de 2-3 picături cloroform timp îndelungat la -4ºC.

Soluția etalon: se diluează astfel: 1 ml soluție standard de fosfat cu 9 ml apă, soluția etalon conține 0,01 mg fosfor/ml.

**Tehnica de lucru.**

În trei eprubete, se introduc:

| Reactivi | Probă | Blanc | Standard |
|---|---|---|---|
| Ser | 0,5 | - | - |
| Apă | - | 0,5 | - |
| Acid tricloracetic | 4,5 | 4,5 | - |
| Filtrare sau centrifugare | | | |
| Filtrat | 2,5 | 2,5 | - |
| Soluție etalon | - | - | 2,5 |
| Molibdat de amoniu | 1 | 1 | 1 |
| Hidrochinonă | 1 | 1 | 1 |
| Sulfit de sodiu | 1 | 1 | 1 |
| Apă distilată | 4,5 | 4,5 | 4,5 |

30 de minute repaus la întuneric pentru dezvoltarea culorii. Colorimetrare la $\lambda = 720$ nm.

**Calcul.**

$$\text{mg P/100 ml ser} = \frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \quad \text{x } 0{,}025 \text{ x } 200$$

### *V.5.4. DOZAREA FOSFORULUI URINAR. METODA BRIGGS*

**Principiul metodei.**

A fost expus la capitolul V.5.3.

**Tehnica de lucru.**

Prezintă anumite particularități legate de pregătirea urinei în vederea determinării fosfaturiei. Urina se agită ușor și i se adaugă câteva picături de HCl concentrat pentru a se dizolva un eventual precipitat de fosfați. Se pot întâlni două posibilități:

- ► urină fără albumină când se lucrează cu o diluție de 1/20;
- ► urină cu albumină, în care caz se măsoară într-o eprubetă: urină 1 ml, acid tricloracetic 20% 2 ml, apă distilată 17 ml. Amestecul se trece într-o baie de apă care clocotește și se menține câteva minute, apoi se răcește și se filtrează. Din acest moment, urina poate fi folosită pentru determinarea fosforului după tehnica de lucru schematizată mai jos:

| Reactivi | Proba | Martor | Standard |
|---|---|---|---|
| Urină | 1 | - | - |
| Acid tricloracetic 10% | 4 | 5 | |
| Se agită și se filtrează probele | | | |
| Filtrat | 2,5 | 2,5 | - |
| Soluție standard | - | - | 2,5 |
| Molibdat de amoniu | 1 | 1 | 1 |
| Sulfat de sodiu 20% | 1 | 1 | 1 |
| Hidrochinonă 1% | 1 | 1 | 1 |
| Apă distilată | 4,5 | 4,5 | 4,5 |

Se agită și apoi repaus 20 de minute la întuneric.

Colorimetrarea la $\lambda = 720$ nm, folosind cuva cu drum optic de 1 cm.

**Calcul.**

$$\text{mg P/100 ml urină} = \frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \times C_s \times D \times 100$$

$C_s$ = concentrația standard;
D = diluația.

### *V.5.4. METODA FĂRĂ DEPROTEINIZARE*

**Principiu.**

Ionii fosfat reacționează cu acidul molibdenic formând un complex, fosfomolibdat de amoniu, care se reduce la **albastru de molibden** colorimetrabil. Adăugarea de metabisulfit inhibă formarea de complexe nespecifice (cu As, Si), iar boratul asigură stabilitatea culorii. Tamponul de carbonat sulfit menține proteinele în soluție la pH 8,7 așa încât **nu mai este necesară deproteinizarea.**

**Reactivi.**

1. Borat metabisulfit (borat 52 mM, metabisulfit 90 nM): se dizolvă 5 g tetraborat de sodiu și 4,5 g metabisulfit de sodiu în 250 ml apă distilată. Se conservă 3 luni la 4°C.

2. Acid molibdenic: se dizolvă 5 g molibdat de amoniu sau de sodiu în 100 ml $H_2SO_4$ 1 N. Se conservă 3 luni la 4°C.

3. Reducător: hidrochinonă 90 mM, acid ascorbic 5 mM: se dizolvă 100 mg hidrochinonă în 5 ml apă și se adaugă 10 mg acid ascorbic (0,1 ml dintr-o fiolă de vitamina C 10%) și se aduce la 10 ml cu apă distilată. Se prepară extemporaneu.

4. Carbonat-sulfit: carbonat 396 nM, sulfit 56 mM: se dizolvă 1,75 g sulfit de sodiu anhidru (sau 3,5 g cristalizat) în 250 ml apă; se adaugă 10,5 g carbonat de sodiu anhidru (sau 28,5 g cristalizat). După solvire totală se filtrează. Se recomandă prepararea la fiecare două săptămâni.

5. Standard: se dizolvă 22 mg fosfat monopotasic $KH_2PO_4$ în 70 ml apă, se adaugă 5 ml $H_2SO_4$ 1 N și se aduce la 100 ml cu apă distilată. Standardul conține 5 mg P/100 ml. Se conservă 3 luni la 4ºC.

**Tehnica de lucru.**

În trei eprubete: probă (P), blanc (B) și standard (S) se pipetează:

| Reactivi | P | S | B |
|---|---|---|---|
| Borat metabisulfit | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Ser, urină, LCR | 0,1 | - | - |
| Standard | - | 0,1 | - |
| Apă distilată | - | - | 0,1 |
| Molibdat | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Reducător | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Se amestecă și se lasă 15 minute la temperatura camerei | | | |
| Carbonat sulfit | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

Se amestecă și după 5-30 minute se măsoară extincțiile probelor (P) și standardului (S) față de blancul (B) la 720 nm, în cuvă de 1 cm.

**Calcul.**

$$\text{mg P/100 ml} = \frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \quad \text{x } 5$$

# V.6. MAGNEZIUL

## *V.6.1. CONSIDERAȚII GENERALE*

Istoria cunoașterii funcțiilor biologice ale magneziului în medicină înregistrează o curbă cu ascensiune lentă, care a prezentat o evoluție exponențială în ultimii 20 de ani.

Primul simpozion privind rolul magneziului în patologia umană are loc în 1971 în Franța, organizat de Societatea pentru Dezvoltarea Cercetărilor privind Magneziul.

Organismul unui om adult conține 24-28 g Mg din care 65-70% se află în oase sub forma unor depozite mai mult sau mai puțin fixe (săruri de calciu și magneziu). Restul magneziului din organism este localizat intracelular (95%) și numai 5% în spațiul extracelular (lichid interstițial, plasmă etc.).

Distribuția sa în diverse țesuturi și organe este neuniformă fiind în mare parte fixat de proteinele celulare.

În celule, magneziul este localizat mai ales la nivelul mitocondriilor și microzomilor.

Rezervele de magneziu se află în schelet de unde poate fi mobilizat în condiții de carență. De aceea, chiar în cazul reducerii drastice a aportului, conținutul în magneziu al diferitelor țesuturi se menține mult timp la un nivel apropiat celui normal.

Tabelul V.11. **DISTRIBUȚIA MAGNEZIULUI ÎN DIFERITE COMPONENTE ALE ORGANISMULUI UMAN**

| | **% din conținutul total de Mg** |
|---|---|
| Lichid extracelular | 1,3 |
| Miocard, mușchi scheletici | 20 |
| Ficat, tiroidă, creier | 10 |
| Hematii | 0,7 |
| Oase | 65-67 |

În organism, magneziul este implicat într-un număr mare de reacții biochimice, aproximativ 300 de enzime fiind dependente de prezența magneziului.

Funcțiile biochimice ale magneziului sunt următoarele:

- sinteza, transportul și utilizarea compușilor macroergici;
- transportul electronilor și protonilor în reacțiile redox;
- sinteza și activarea unor enzime implicate în metabolismele glucidic, lipidic, proteic și al acizilor nucleici;
- menținerea integrității structurale și funcționale a membranelor celulare, formând complexe cu fosfolipidele. Complexarea sa cu fosfolipidele reduce fluiditatea membranei și scade permeabilitatea acesteia paralel cu efectele de polarizare electrostatică;

► funcționează ca antagonist fiziologic al calciului, împiedicând intrarea calciului în celule și fixarea sa intracelulară;

► cuplează fosforilarea și producerea de ATP cu lanțul respirator. Carența de magneziu este însoțită de accelerarea respirației celulare, dar reducerea fosforilării;

► reglarea excitabilității neuromusculare;

► formarea și mineralizarea oaselor, acționând simultan asupra osteoblastelor și osteoelastelor;

► activarea sistemului complement și sinteza anticorpilor;

► acționează ca antitoxic, antialergic și factor antistres.

Pentru un adult de talie medie, necesarul de magneziu este 300-400 mg zilnic.

Magneziul este relativ greu absorbabil, doar 30% din cantitatea ingerată putând fi absorbită.

Absorbția se face la nivelul intestinului subțire, și mai puțin în intestinul gros prin difuzie pasivă și difuzie facilitată.

Absorbția magneziului diferă de forma în care există (sărurile de magneziu absorbite diferă în funcție de anion: clorura de magneziu mai rapid decât sulfatul de magneziu), de compoziția alimentelor și de diferite secreții intestinale. Absorbția este facilitată de o ușoară aciditate, un conținut crescut de proteine, acizi grași nesaturați, vitamine D și din complexul B, sodiu. De asemenea, absorbția este intensificată în condițiile unei alimentații cu produse sărace în magneziu.

Absorbția este diminuată în cazul unei diete conținând unele proteine vegetale, săruri de amoniu, grăsimi saturate, alcool, exces de calciu și fosfor.

După ce a fost absorbit de lumen în celulele parietale, trece în sânge printr-un mecanism activ, fiind distribuit țesuturilor.

Principala cale de eliminare este cea renală. Magneziul este filtrat la nivelul glomerulului, reabsorbit tubular în proporție de 95% și secretat într-o mică proporție în ramura descendentă a ansei lui Henle.

Eliminarea de magneziu prin sudoare este mai puțin importantă, în timp ce la nivelul intestinului pot exista, în anumite situații, pierderi semnificative care pot conduce la un deficit magnezic.

Concentrația magneziului în plasmă se numește **magneziemie.**

În plasmă, magneziul se găsește sub două forme:

- neultrafiltrabil - complexat cu proteine (aproximativ 1/3 din totalul magneziului plasmatic). Dintre proteinele plasmatice, albumina este cea care poate fixa magneziul;
- ultrafiltrabil (aproximativ 2/3 din magneziul total) - reprezentat de:
  - magneziu complexat cu diferiți anioni: lactat, citrat ș.a. (aproximativ 7% din total)
  - magneziu ionic - 60% din magneziul total.

Forma ionizabilă a magneziului este responsabilă de activitățile biologice.

Magneziemia variază foarte puțin la un individ ceea ce înseamnă că există un control riguros al acestui parametru. Principalele organe care intervin sunt rinichii, intestinul, paratiroidele, tiroida, suprarenala. Spre deodsebire de calciu, în cazul magneziului nu se cunosc hormoni specifici. Unii hormoni determină creșterea magneziemiei (parathormon, mai puțin calcitomină), iar alții favorizează eliminarea sa (glucocorticoizi, catecolamine).

Orice creștere fiziologică a magneziemiei este urmată rapid de intensificarea eliminării urinare. În cazul unui deficit de magneziu, pierderile urinare ale acestui element sunt mult diminuate.

Tabelul V.12. **VALORILE NORMALE ALE MAGNEZIULUI**

| | | **mg/100 ml** | **mmol/l** | **mEq/l** |
|---|---|---|---|---|
| Plasmă | copii | 1,6-2,4 | 0,65-0,98 | 1,33-2 |
| | adulți | 1,8-3 | 0,74-1,24 | 1,5-2,5 |
| | | **mg/24 h** | **mmol/24 h** | **mEq/24 l** |
| Urina | adulți | 50-150 | 2,1-6 | 4,1-12,5 |

Factorii care determină variații fiziologice ale magneziemiei sunt vârsta, efortul fizic și intelectual, alimentația.

Variațiile patologice ale magneziemiei sunt prezentate în tabelul V.13.

Tabelul V.13. **VALORILE PATOLOGICE ALE MAGNEZIULUI SERIC**

| Hipermagneziemia | Hipomagneziemia |
|---|---|
| • insuficiență renală;<br>• boala Addison;<br>• hipertiroidism. | ▪ diaree, vărsături;<br>▪ spasmofilie;<br>▪ comă diabetică;<br>▪ aldosteronism;<br>▪ mixedem. |

Spre deosebire de magneziemie, magneziuria este un parametru deosebit de variabil, valoarea sa depinzând de cantitatea ingerată, gradul de absorbție al diferiților produși, echilibrul neuro-hormonal, efortul fizic. Pentru că rinichiul compensează rapid valoarea magneziemiei, o magneziurie scăzută este un semn important de deficit magnezic. Trebuie luate în considerare ca posibil patologic valori mai mici de 50 mg/24 h sau mai mari de 150 mg/24 h.

Eliminările de magneziu se corelează întotdeauna pozitiv cu ingestia de proteine, raportul Mg/uree rămânând constant.

Magneziul urinar (mg/24 h)/uree urinară (g/24 h) = 4,7±1,8. O scădere a acestui raport este semnificativă pentru stările de deficit magnezic (spasmofilie, diabet etc.).

Acest raport scăzut arată imposibilitatea compensării deficitului de magneziu, deoarece o dietă bogată în proteine determină creșterea eliminării de magneziu prin urină. O alimentație hipoproteică limitează magneziemia.

În absența unei insuficiențe renale, reducerea magneziemiei și scăderea raportului Mg/uree sub valoarea 3 sunt indicatori ai unui deficit magnezic sever.

### *V.6.3. METODE DINAMICE DE STUDIU AL METABOLISMULUI MAGNEZIULUI*

Pentru a investiga corect participarea magneziului la procesele biochimice din multe țesuturi și lichide biologice sunt indicate metodele ce utilizează **izotopi radioactivi** și **testele de încărcare.**

Din păcate, izotopii radioactivi ai magneziului ($^{26}Mg$, $^{27}Mg$, $^{28}Mg$,) au o perioadă de înjumătățire foarte scurtă și, în consecință, sunt greu manevrabili.

Testele de încărcare reprezintă, teoretic, o metodă foarte bună de identificare a unui deficit magnezic, situație în care organismul ar reține un procent mai mare din magneziul administrat.

Testele de încărcare rapidă întrebuințează calea parenterală, cele de încărcare lentă calea orală.

În probele de încărcare parenterală cu magneziu, evaluarea depleției de magneziu se face astfel:

- curba magneziemiei (este plată în cazul deficitului);
- magneziuria - care este scăzută;
- urmărirea combinată a magneziemiei și magneziuriei în cadrul unor situații de bilanț global;
- evaluarea magneziului intracelular: eritrocite, celule musculare.

Cea mai utilizată metodă este cea care urmărește eliminarea în urină în primele 4 ore de la administrarea dozei de încărcare.

### *V.6.4. DOZAREA MAGNEZIULUI*

Dozarea magneziului trebuie să fie una din analizele de rutină în laboratorul clinic, deoarece deficiența de magneziu poate antrena disfuncții ale oricărui organ sau sistem, inclusiv complicații potențial letale.

Pentru determinarea magneziului total plasmatic se folosesc diferite metode:

- spectrofotometrie cu absorbție atomică;
- spectrofotometrie de emisie;

- metode colorimetrice;
- metode complexometrice;
- metode cromatografice.

Metodele colorimetrice sunt cele mai des folosite deoarece sunt rapide, exacte și nu necesită aparatură specială (spectrofotometre de absorbție atomică sau de emisie).

Pentru determinarea magneziului ionizat în lichide, dar și în celule se folosesc electrozi cu sensibilitate specifică pentru magneziu care asigură obținerea rezultatului într-un timp foarte scurt și nu sunt influențați de concentrațiile altor ioni.

### *V.6.5. METODA COLORIMETRICĂ*

**Principiu**

În mediu alcalin, ionii de magneziu formează cu "galbenul de titan" un complex de culoare roșie-cărămizie.

Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația elementului în proba respectivă. Pentru a evita descompunerea se adaugă alcool polivinilic drept stabilizator.

**Reactivi**

1) Acid tricloracetic 10%.

2) Stabilizator: soluție de alcool polivinilic 10%. Se conservă o lună la frigider.

3) Soluție stoc de colorant 0,5% preparată prin dizolvarea a 0,5 g galben de titan în 100 ml apă distilată. Se conservă trei luni la frigider.

4) Soluție de colorant de lucru 0,9% pregătită prin diluarea a 0,5 ml soluție stoc de colorant și apă distilată într-un balon cotat de 25 ml. Se conservă o săptămână la frigider.

5) Soluție NaOH 2N.

6) Soluție standard de magneziu 1 mg/ml (stoc) obținută prin dizolvarea a 1,0129 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ în 100 ml $H_2SO_4$ 0,1 N.

7) Soluție standard de lucru pregătită prin diluarea a 0,25 ml soluție stoc cu apă distilată într-un balon cotat de 50 ml. Are concentrație 0,005 mg Mg/ml.

**Tehnica de lucru**

| Reactivi | Probă | Standard | Martor |
|---|---|---|---|
| Plasmă | 0,5 | - | - |
| Apă distilată | 0,5 | - | - |
| Acid tricloracetic 10% | 1 | | |
| Agitare. Repaus 5 minute. Filtrare sau centrifugare. | | | |
| Supernatant (filtrat) | 1 | - | - |
| Standard de lucru | - | 1 | - |
| Apă distilată | - | - | 1 |
| Alcool polivinilic | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Colorant de lucru | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| NaOH 2N | 1 | 1 | 1 |

Agitare. Repaus 10 minute. Se citesc extincțiile la $\lambda = 540$ nm.

**Calcul**

$$\text{mg Mg/100 ml} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \times 0{,}005 \times \frac{100}{0{,}25} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \times 2$$

sau

$$\text{mEq/l} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_M} \times 1{,}62$$

# VI. INTERPRETAREA DIAGNOSTICĂ A VARIAȚIEI ACTIVITĂȚILOR ENZIMELOR SERICE

## VI.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Determinarea activităților enzimelor serice a devenit în prezent o importantă modalitate de apreciere a stării funcționale a organismului, fiind deci de un real ajutor în diagnosticul clinic, odată cu observația semnalată de Warburg în 1943 că o serie de enzime implicate în diverse metabolisme celulare sunt prezente și în ser.

Începând de la această dată, numărul de enzime a căror activitate a fost determinată în ser a crescut deosebit de mult, în timp selecționându-se acele enzime ce pot defini mai exact anumite stări patologice datorită modificării activităților acestora și constituind indicii de mare folos clinicienilor în aprecierea naturii, gravității și evoluției afecțiunilor respective.

### *VI.1.1. PROVENIENȚA ENZIMELOR*

Majoritatea proceselor enzimatice au loc la nivel celular, iar laboratorul clinic încearcă să contribuie la problemele de diagnostic, pe baza determinării activității enzimelor în special în serul sanguin.

Pentru ca investigarea clinică a enzimelor plasmatice să furnizeze relații diagnostice este important de cunoscut locul de producere a diverselor enzime, precum și mecanismele prin care aceste enzime ajung din celule în sânge.

Din punct de vedere fiziopatologic și al diagnosticului clinic, enzimele serice sunt clasificate după Richterich în următoarele categorii:

I. **Enzime secretate activ în plasmă,** mai ales de către ficat. Acționează asupra unor substanțe din plasmă, din care cauză sunt denumite **enzime plasmatice funcționale.**

Aceste enzime sunt sintetizate în general la nivelul ficatului, care le secretă activ în plasmă. Scăderea activității plasmatice a acestor enzime funcționale este expresia unei sinteze proteice defectuoase în ficat și traduce o **lezare hepatică** gravă.

Tabelul VI.1. **CLASIFICAREA ENZIMELOR SERICE**

| **Categoria** | **Enzime** | **Roluri biologice** |
|---|---|---|
| I. Enzime plasmatice funcționale | • lecitin colesterol acil transferaza (LCAT) | ▪ metabolismul colesterolului |
| | • lipoproteinlipaza | ▪ metabolismul lipoproteinelor |
| | • pseudocolinesteraza | ▪ metabolismul acilcolinei |
| | • ceruloplasmina | ▪ transportor de cupru |
| **Categoria** | **Enzime** | **Surse** |
| II. Enzime ale secrețiilor exocrine | • amilaza, lipaza, tripsina | ▪ pancreas |
| | • pepsinogen | ▪ duoden |
| | • fosfataza alcalină | ▪ ficat |
| | • fosfataza acidă | ▪ prostată |
| **Categoria** | **Enzime** | **Cauza** |
| III. Enzime celulare | • transaminaza glutamicoxalacetică | ▪ necroza miocardică |
| | • creatinfosfokinaza | ▪ necroza miocardică |
| | • transaminaza glutamic piruvică | ▪ sindrom hepatolitic |
| | • ornitin carboimil transferaza | ▪ sindrom hepatolitic |
| | • lactatdehidrogenaza | ▪ sindrom hepatolitic |

Absența acestor enzime în plasmă se poate datora unei erori genetice moștenite, cum este în cazul bolii Wilson caracterizată printr-o deficiență a ceruloplasminei. Absența genetică a pseudocolinesterazei are ca rezultat sensibilitatea subiecților respectivi la unele anestezice din clasa acilcolinei.

II. **Enzime ale secreţiilor exocrine** care pot difuza pasiv în sânge, fără a avea un rol la acest nivel. Activitatea acestor enzime scade în sânge în caz de atrofie a organelor producătoare; creşte în cazuri de obstrucţie a conductelor excretoare sau în caz de creştere a permeabilităţii membranei celulelor producătoare.

III. **Enzime celulare** ce activează exclusiv intracelular şi ale căror substraturi nu se găsesc în plasmă. Aceste enzime, denumite şi **enzime plasmatice nefuncţionale,** se găsesc în plasmă în cantităţi mult mai mici decât în celule.

Din punct de vedere medical, enzimele celulare sunt cele mai utile pentru diagnosticul clinic deoarece se găsesc într-o proporţie limitată în serul indivizilor sănătoşi şi prezintă creşteri până la 100-300 de ori faţă de normal în cazul unor afecţiuni, datorită unor cauze pe care le vom analiza ulterior.

În tabelul VI.1. sunt prezentate câteva din enzimele serice.

## • *VI.1.2. REPARTIZAREA INTRACELULARĂ A ENZIMELOR*

Localizarea intracelulară a enzimelor la nivelul diverselor organite celulare are o deosebită semnificaţie funcţională în dirijarea proceselor metabolice.

Repartizarea intracelulară a diverselor enzime trebuie să fie cunoscută dintr-o serie de considerente utile pentru pentru diagnosticul clinic, deoarece o leziune celulară care duce la eliberarea din celule a enzimelor mitocondriale este mai gravă decât o leziune limitată la membrana celulară şi care duce doar la ieşirea enzimelor citoplasmatice.

Enzimele mitocondriale, pentru a putea ajunge la ser, trebuie să depăşească, pe lângă bariera pe care o reprezintă membrana celulară, şi pe cea mitocondrială. De aceea, gravitatea unei boli se poate aprecia şi prin natura enzimei a cărei activitate creşte în ser.

În mod evident, există şi enzime tipic nucleare sau localizate în ribozom sau reticulul endoplasmatic, dar aceste enzime au o importanţă clinică mai redusă decât cele citoplasmatice şi

mitocondriale. În tabelul VI.2. sunt prezentate câteva exemple cu localizarea lor intracelulară.

Tabelul VI.2. **LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A ENZIMELOR**

| **Enzime citoplasmatice** | **Enzime mitocondriale** | **Enzime cu localizare mixtă** |
|---|---|---|
| • hexokinaza<br>• aldolaza<br>• lactat dehidrogenaza<br>• transaminaza glutamic piruvică | ▪ glutamat dehidrogenaza<br>▪ piruvat dehidrogenaza<br>▪ izocitrat dehidrogenaza<br>▪ succinatdehidrogenaza | ◆ transaminaza, glutamic, oxalacetică (70% în mitocondrie, 30% în citoplasmă),<br>◆ malatdehidrogenaza (40% în mitocondrie, 60% în citoplasmă) |

## *VI.1.3. REPARTIZAREA ENZIMELOR ÎN ȚESUTURI ȘI ORGANE*

În funcție de particularitățile metabolice ale unui organ, acesta prezintă un spectru enzimatic propriu. Având în vedere că, datorită unei activități metabolice identice, organe diferite pot avea aceleași enzime dar în proporții diferite, este necesară pentru fiecare organ alcătuirea unui "profil enzimatic" (vezi figura VI.1.). Cu cât profilul enzimatic este mai complet conturat, cu atât el este mai concludent pentru o afecțiune sau alta a organului lezat.

Există enzime tisulare specifice și organ specifice, fapt deosebit de important pentru înțelegerea naturii unei afecțiuni, creșterea activității unei astfel de enzime în ser denotând în mod neândoelnic tulburarea metabolică sau structurală a unui singur organ.

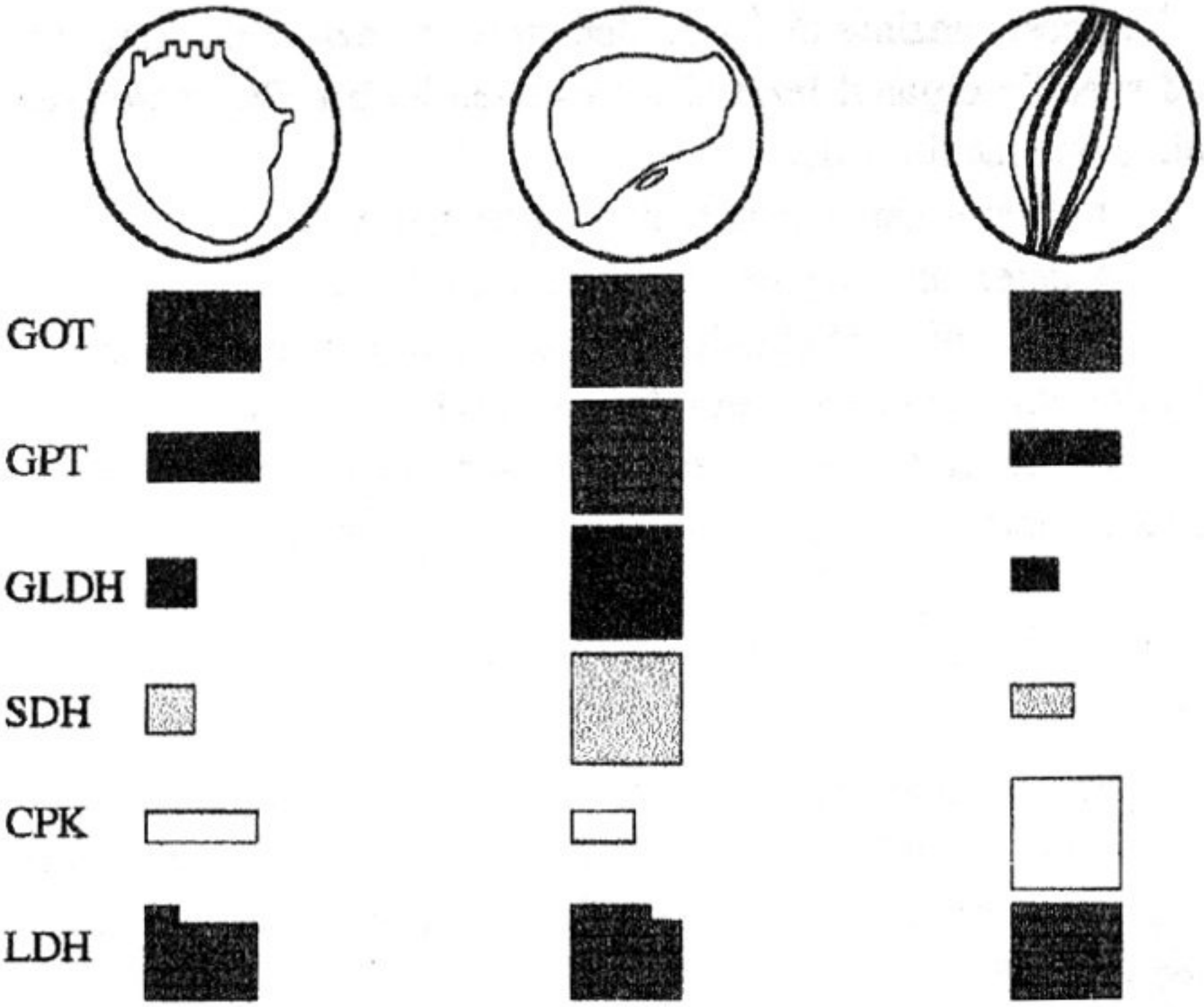



Fig.VI.1. **Profilul enzimatic al unor organe**

Tabelul VI.3. **REPARTIZAREA ORGAN SPECIFICĂ A PRINCIPALELOR ENZIME CU ROL DIAGNOSTIC ÎN BIOCHIMIA CLINICĂ**

| Organ | Enzime | Cod |
|---|---|---|
| Ficat | • glutamatdehidrogenaza<br>• ornitin carboimil transferaza<br>• sorbitoldehidrogenaza<br>• izoenzima LDH-M | EC1.4.1.3<br>EC2.1.2.3<br>EC1.1.1.14<br>EC1.1.1.2 |
| Mușchi scheletici și miocard | • creatinkinaza<br>• izoenzima creatinkinaza MB<br>• izoenzima LDH-M<br>• izoenzima LDH-H | EC2.7.3.2<br>EC1.1.1.2<br>EC1.1.1.2<br>EC2.7.3.2 |
| Prostată | • fosfataza acidă | EC3.1.3.2 |
| Pancreas | • amilaza | EC3.2.1.1 |

Aceste enzime mai sunt denumite și enzime marker, indicând în mod specific organul lezat și intensitatea lezării. Precizarea sediului leziúnilor este facilitată de:

- determinarea activității enzimelor specifice;
- determinarea izoenzimelor (zimograma);
- determinarea simultană a mai multor enzime cu compararea raporturilor enzimatice cu acelea de la subiecții normali.

În tabelul VI.3. redăm repartizarea organ specifică a principalelor enzime.

### *VI.1.4. IZOENZIME*

Izoenzimele sunt forme moleculare multiple ale aceleași enzime. Acestea catalizează aceeași reacție, dar se deosebesc unele de altele prin **structură, proprietățile fizico-chimice, caracteristici cinetice** și **localizare tisulară.**

Pe baza acestor diferențieri ele pot fi identificate și separate electroforetic. Separarea izoenzimelor este mult utilizată în chimia clinică pentru precizări de diagnostic în vederea conturării profilului enzimatic al organului lezat. Așa de exemplu, lactatdehidrogenaza din ser poate fi separată electroforetic în gel de agar, amidon sau acetat de celuloză în 5 fracțiuni.

Distingem astfel formele **mușchi** și formele **inimă** ale lactatdehidrogenazei, izoenzimele hepatice, duodenale și osoase ale fosfatazei alcaline etc. În prezent există peste 200 de enzime ce reprezintă forme moleculare multiple care pot fi caracterizate electroforetic, deoarece izoenzimele având structuri variate, vor migra într-un câmp electric cu viteze distincte.

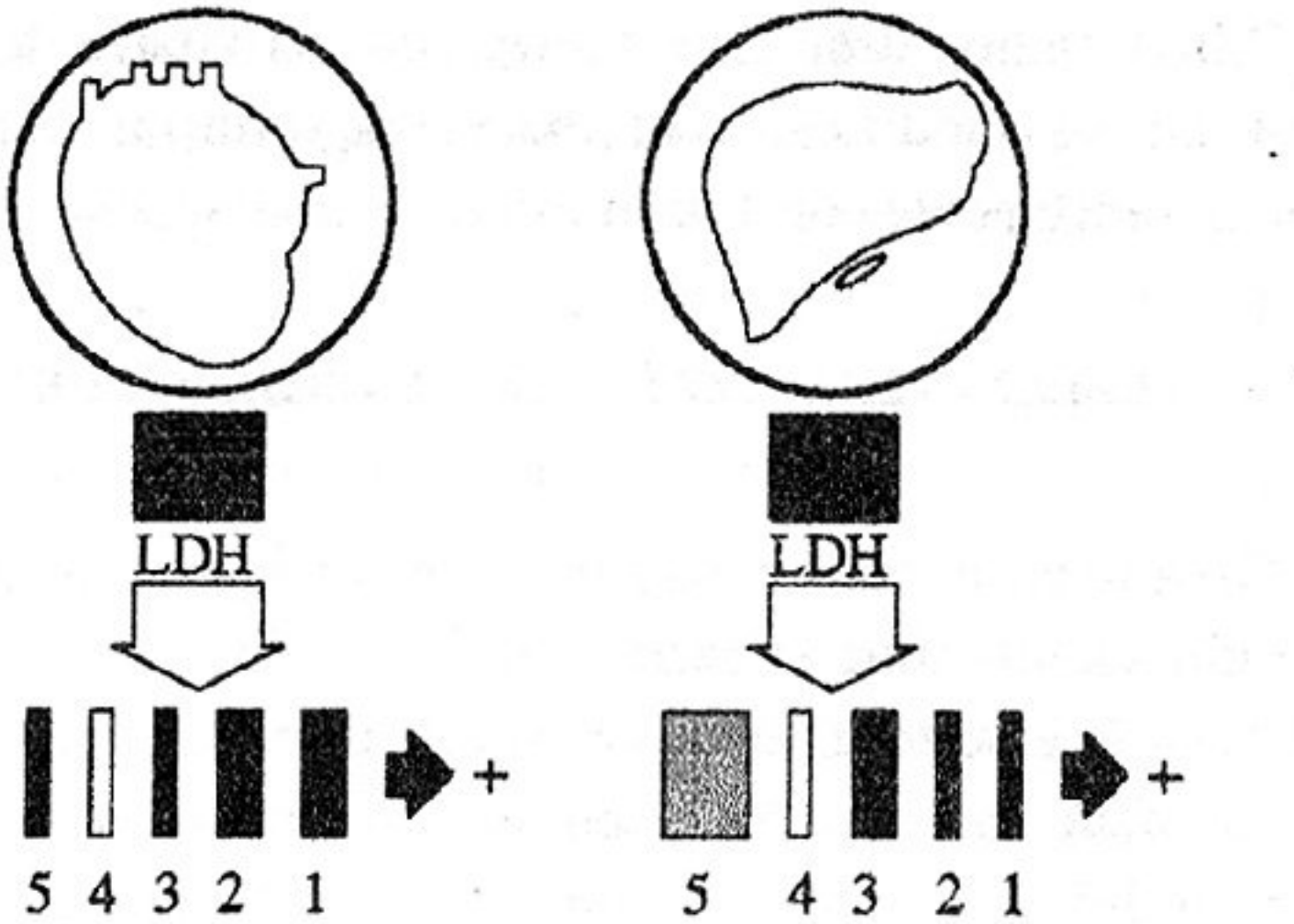



**Fig.VI.2. Repartiția izoenzimelor LDH în cadrul profilului enzimatic al inimii și ficatului**

Din motivele semnalate, cele 5 izoenzime ale lactatdehidrogenazei pot defini fără echivoc natura hepatică, respectiv cea cardiacă a unei afecțiuni prin creșterea activității specifice a uneia din cele două tipuri de izoenzime parentale. Formele parentale hepatice, respectiv cardiace sunt formate din patru lanțuri polipeptidice discret distincte. Prin combinarea lor se pot forma încă trei hibrizi, forme interconvertibile conform graficului (figura VI.3.).

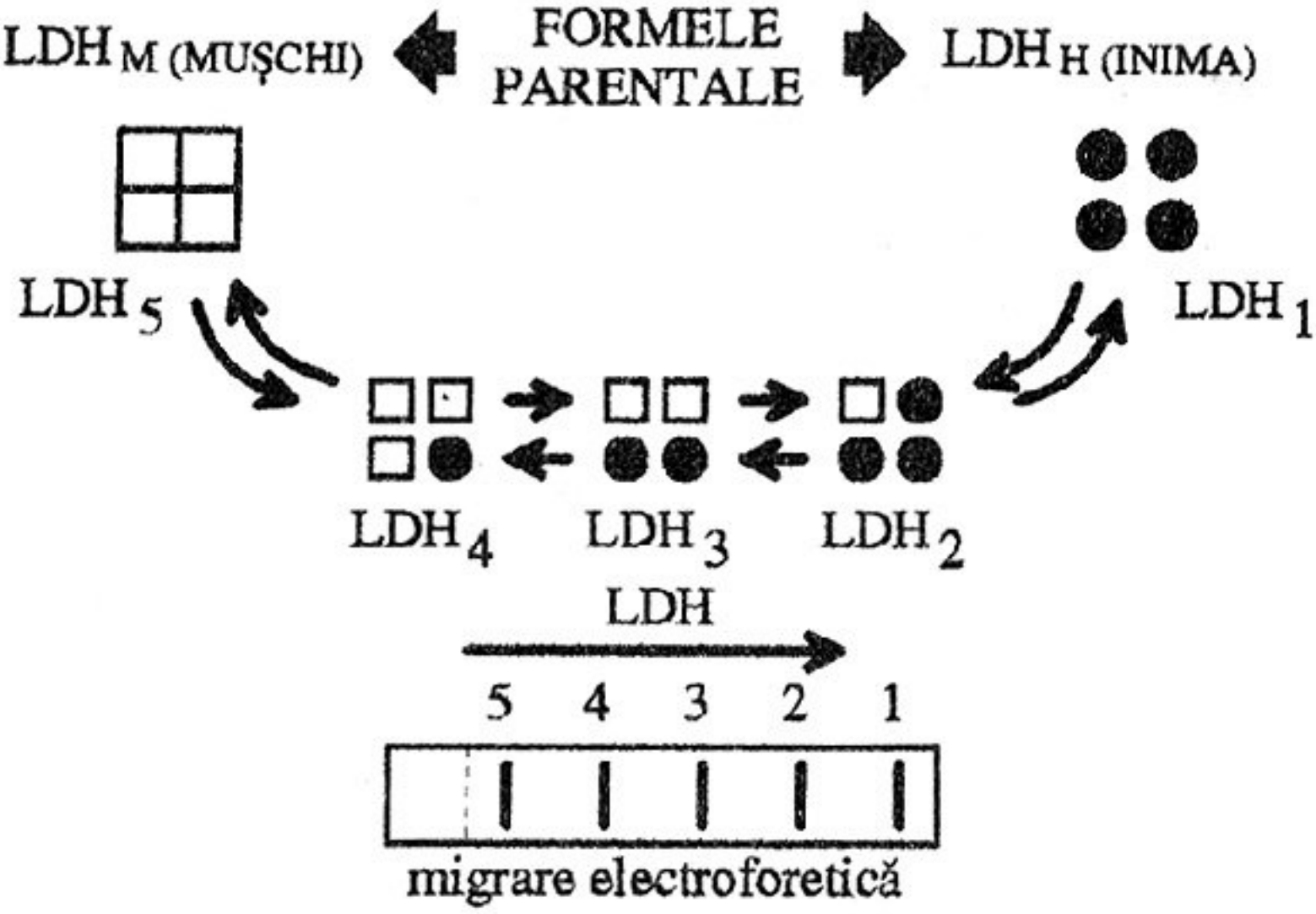



**Fig.VI.3. Izoenzimele LDH**

Prin urmare, deşi este posibil ca activitatea totală a unei enzime să nu se modifice, schimbarea raporturilor cantitative ale izoenzimelor serice poate constitui o indicaţie în diagnostic.

### *VI.1.5. CAUZELE PREZENŢEI ÎN SER A ENZIMELOR CELULARE*

Dacă luăm în considerare marea diferenţă dintre concentraţiile enzimelor din spaţiile intra şi extracelulare, şi anume mare în interiorul celulei şi mică în exteriorul ei şi, pe de altă parte, dacă avem în vedere întinsa suprafaţă a maselor celulare, comparativ cu aceea a compartimentului vascular, putem decât să apreciem eficienţa funcţională a membranelor celulare.

Membrana celulară este în strânsă interconexiune cu sistemul canalicular intracelular, iar prin procesul de veziculare a membranei, componentele celulare macromoleculare (enzimele funcţionale) pot fi secretate în mediul extracelular.

Funcţia complexă a membranelor este dependentă de metabolismul celular şi implicit de energia rezultată din acesta. Cu alte cuvinte, activitatea funcţională a membranelor este dependentă, atât de integritatea celulei în ansamblu, cât şi de suma activităţilor metabolice din organele celulare care o compun - mitocondrii, ribozomi, nucleu şi citoplasmă.

Mecanismul de eliberare în ser a enzimelor tisulare a putut fi studiat prin cercetări efectuate pe:

- serul bolnavilor cu diverse afecţiuni;
- animale de experienţă cărora li s-a ligaturat un vas de sânge pentru a li se provoca o anoxie la nivelul unui organ anumit (inimă, ficat, rinichi);
- organe izolate;
- animale de experienţă hrănite cu o alimentaţie deficitară sau cu exces în anumite substanţe ce pot provoca o serie de tulburări;
- animale de experienţă cărora li s-au inoculat sau introdus diferite substanţe toxice, microbi, virusuri.

Toate aceste studii au permis să considerăm că eliberarea în concentrații normale în ser a enzimelor se datorează următoarelor cauze:

► **schimbarea permeabilității celulare,** în urma modificării metabolismului energetic sau a tulburării metabolismului general al celulelor din țesutul respectiv;

► **lezarea,** din diverse motive, a unor **formațiuni subcelulare,** mai ales a **mitocondriilor;**

► unei **necroze tisulare,** ca o consecință a unor diverse cauze, dar mai ales unei hipoxii, a unei oxigenări defectuoase, de obicei în faza acută a bolii.

Așadar, ieșirea enzimelor din celule și trecerea lor în plasmă se poate produce sub acțiunea unor factori patogeni, cum ar fi cei infecțioși (virali și bacterieni), toxice de natură chimică, tulburări circulatorii și traumatisme ce pot duce la un aport insuficient de oxigen sau substanțe (ex. glucoză) în țesuturi. Acțiunea acestor noxe are ca prim efect un efort de adaptare metabolică a celulei la noile condiții (de stress), în scopul contracarării efectului noxei. Acest efort poate epuiza celula într-o măsură mai mare sau mai mică, în funcție de amploarea și durata acțiunii factorului patogen.

Epuizarea celulei se traduce în primul rând prin scăderea producerii de ATP intracelular, cu diminuarea, în consecință, a tuturor proceselor energodependente și, în primul rând, a funcției de membrană, a trasportului activ.

Modificarea de permeabilitate a membranelor va permite enzimelor intracelulare să iasă în spațiul extracelular și de aici în plasmă. Cu cât amploarea leziunii este mai mare, cu atât concentrația în plasmă a enzimelor intracelulare va fi mai mare, indicând un amplu proces de citoliză.

Enzimele citoplasmatice sunt primele care trec în plasmă, în timp ce ieșirea enzimelor mitocondriale se realizează numai în cazul unei acțiuni severe și prelungite a factorului patogen.

Prin urmare determinarea activității enzimelor intracelulare în plasmă poate servi diagnosticului clinic prin corelația dintre extinderea și severitatea leziunii și amploarea creșterii activității enzimelor plasmatice.

## VI.2. MODALITĂȚI DE CARACTERIZARE A ENZIMELOR

### *VI.2.1. UNITĂȚI DE EXPRIMARE A ACTIVITĂȚII ENZIMATICE*

Pentru exprimarea activității enzimatice, în prezent se utilizează numeroase sisteme de unități, uneori arbitrare, ceea ce face dificilă compararea rezultatelor.

Pentru o exprimare unitară a activității enzimelor, a fost adoptată, după recomandările I.U.B. (Uniunea Internațională de Biochimie), exprimarea în "unități internaționale" (U.I. sau U).

**Unitatea internațională** de activitate enzimatică este cantitatea de enzimă care transformă 1 μmol substrat/minut la 25ºC în condiții optime (concentrația substratului, forța ionică a tamponului, pH optim).

1 UI = 1 μmol substrat/minut

În biochimia clinică, pentru determinările din lichide biologice, ser, plasmă sau urină se obișnuiește ca activitatea enzimatică să se raporteze la 1 ml de ser sau plasmă. Pentru a se evita cifrele mici în exprimarea rezultatelor, s-a convenit asupra termenului de miliunitate (mU) pe ml, o miliunitate fiind a mia parte dintr-o unitate. Din punct de vedere numeric 1 U/l este identică cu 1 mU/ml.

Comisia pentru Enzime a I.U.B. a dispus și introducerea unității catalitice denumite **katal**, definită ca activitate enzimatică ce poate transforma 1 micromol de substrat pe secundă.

1 nanokatal = 1 n kat = 1 μmol/sec = 0,06 U; 1 U = 16,67 nkat

Unitățile arbitrare în care sunt exprimate unele activități enzimatice pot fi convertite în unități internaționale prin multiplicarea cu anumiți factori de corecție (vezi tabelul VI.3.).

Tabelul VI.3. **CONVERSIA ÎN UI A ALTOR TIPURI DE UNITĂȚI ENZIMATICE**

| Enzima | Unități vechi | Factor de corecție |
|---|---|---|
| Aldolaza | • Burns<br>• Schapira | 0,61<br>16,00 |
| Amilaza | • Somogyi<br>• Wohlgemuth | 20,60<br>20,60 |
| Fosfataza alcalină | • King Armstrong<br>• Bessey-Lowry | 7,10<br>16,70 |
| Fosfataza acidă | • Bodansky<br>• King Armstrong | 5,40<br>7,80 |
| Transaminaze | • Karmen | 0,6 |

## *VI.2.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR*

În plasmă sau în extracte tisulare, enzimele se găsesc în cantități extrem de mici, ceea ce va îngreuna aprecierea lor cantitativă cu metode de dozare a proteinelor. Din acest motiv, dozarea enzimelor se bazează pe determinarea activității lor, adică pe capacitatea lor de a cataliza o anumită reacție.

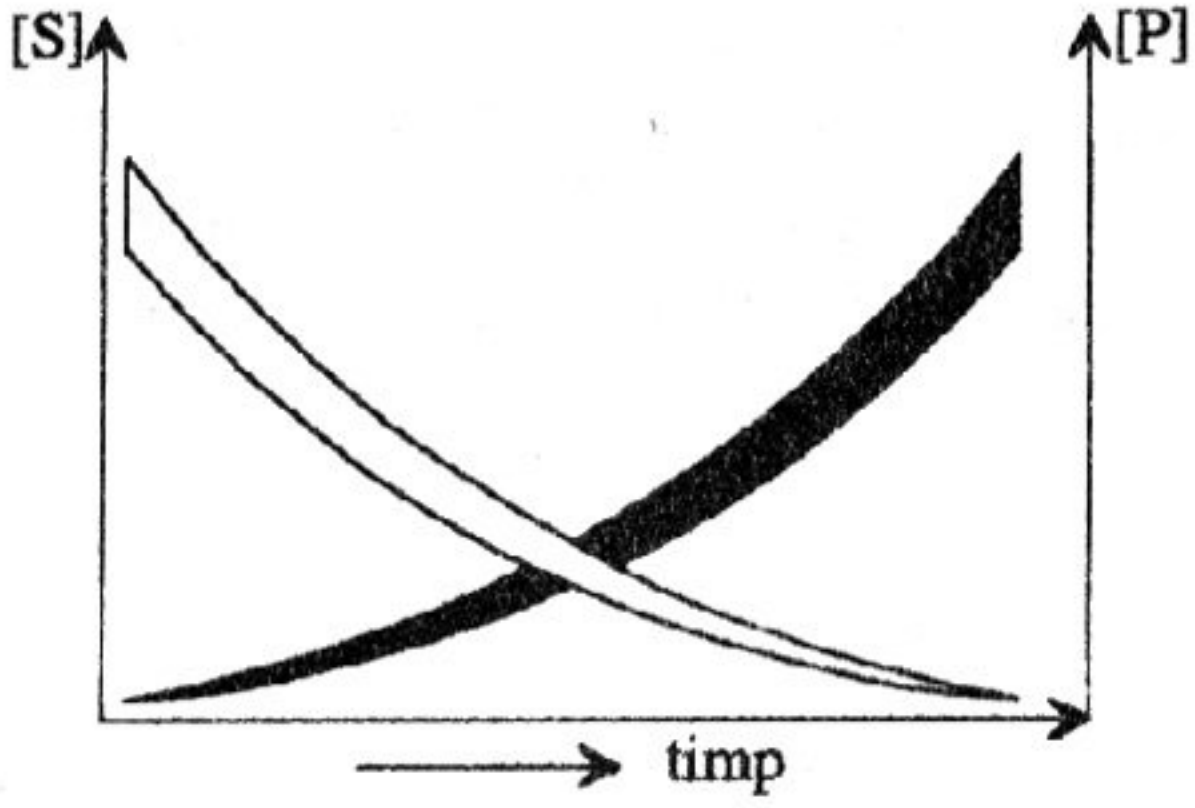



Fig.VI.4. **Scăderea în funcție de timp a concentrației substratului**

Activitatea enzimelor se determină prin măsurarea scăderii concentrației substratului sau creșterii concentrației de produs format în condiții optime, care se referă la natura și concentrația substratului. Evoluția unui astfel de proces poate fi ilustrat în schema de mai sus (figura VI.4.).

Aceste condiții se aleg în așa fel încât echilibrul să se deplaseze complet într-un sens, având în vedere că multe din reacțiile enzimatice sunt ireversibile. Timpul de incubare a unei enzime cu substratul ei în condiții optime variază de la o enzimă la alta și nu trebuie să depășească o oră. Timpul limitat de incubare este impus de următorii factori:

- menținerea proporționalității între concentrația substratului transformat și timp;
- evitarea denaturării enzimei și apariția produșilor finali de reacție în concentrații care să inhibe activitatea enzimei;
- împiedicarea contaminării bacteriene.

Determinarea cantității de substrat transformată sau a produsului de reacție ce apare se efectuează cu metode **colorimetrice, spectrofotometrice, titrimetrice, conductometrice** etc.

Practic, activitatea enzimelor se determină prin:

I. - **Metode cu timp fix de incubare** (metodele în două puncte)

Această categorie de metode folosește un martor (cu enzima inactivată) și o probă cu enzimă activă. După un interval de timp fix de incubare cu substratul se inactivează și enzima din proba activă. În final, activitatea enzimatică se apreciază prin diferența dintre probă și martor în concentrația de substrat sau a produșilor de reacție care se dozează prin diverse metode.

II. - **Metode cinetice**

În acest caz se urmărește vizual sau cu aparate înregistratoare mersul reacției enzimatice fără întrerupere.

### *VI.2.2.1. METODE CINETICE*

Dintre metodele cinetice foarte utilizate este "**testul optic**" introdus de Warburg și Christian pentru determinarea activității enzimelor transportoare de hidrogen, care folosesc drept coenzime $NAD^+$ sau $NADP^+$.

$$XH_2 + NAD^+ \rightarrow X + NADH + H^+$$

$$XH_2 + NADP^+ \rightarrow X + NADPH + H^+$$

Aceste metode se bazează pe faptul că NADH sau NADPH (forme reduse) posedă un maximum de absorbție la lungimi de undă cuprinse în domeniul din spectru 300-370 nm, pe când $NAD^+$ sau $NADP^+$ absorb foarte puțin în această zonă spectrală (vezi figura VI.5.).

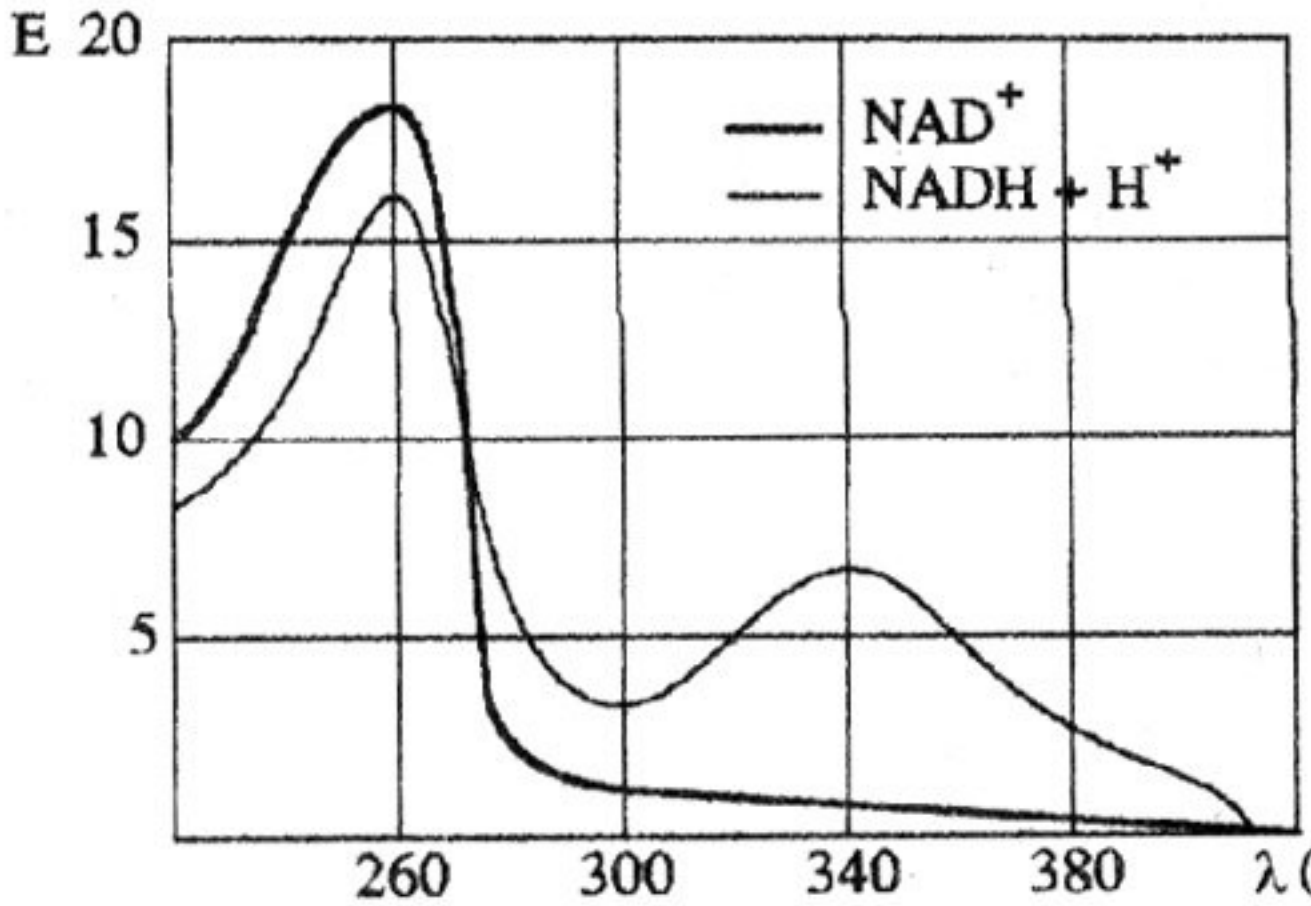



**Fig.VI.5. Spectrele de absorbție ale $NAD^+$ și $NADH + H^+$**

Există trei variante de folosire a testului optic și prin aceasta există posibilitatea determinării activității multor enzime în laboratorul clinic.

A. - **Testul optic simplu.** Se introduce în cuvă serul conținând enzima $NAD^+$ dependentă, tamponul adecvat, substratul și se urmărește modificarea extincției. Astfel este determinată lactatdehidrogenaza:

$$Piruvat + NADH + H^+ \rightarrow Lactat + NAD^+$$

Se incubează serul, tamponul și NADH + $H^+$ la pH = 7,5 până ce se stabilizează extincția, apoi se declanșează reacția prin adăugarea piruvatului. Scăderea extincției este proporțională cu activitatea enzimei. Pe această cale se poate determina activitatea sorbitol-dehidrogenazei, glucozo-6-fosfatdehidrogenazei, izocitrat-dehidrogenazei, glutamatdehidrogenazei și a altor dehidrogenaze.

B. - **Testul optic cuplat cu o reacție suplimentară.** În cazul enzimelor care nu reacționează cu $NAD^+$, se poate cupla reacția catalizată de acestea cu o reacție indicatoare. Produsul format prin acțiunea enzimei a cărei activitate dorim să o determinăm, este dozat printr-o altei enzime $NAD^+$ dependente. De exemplu, la determinarea glutamico-piruvico-transaminazei (GPT, ALAT) se folosește reacția:

L-alanina + α-cetoglutarat → L-glutamat + Piruvat

Piruvatul este apoi determinat prin reacția de la punctul A. Fiecare mol de piruvat format din alanină oxidează un mol de NADH + $H^+$ la $NAD^+$ și este redus la lactat. Deci scăderea extincției pe minut este direct proporțională cu viteza reacției de transaminare. La fel se poate determina glutamico-oxalacetico-transaminaza (GOT, ASAT), aldolaza sau piruvatkinaza.

C. - **Testul optic cuplat cu o reacție auxiliară și o reacție indicatoare.** Dacă produsul rezultat din prima reacție nu poate fi dozat direct printr-o reacție indicatoare, se poate intercala un sistem enzimatic auxiliar. De exemplu, în cazul determinării activității creatinkinazei, reacția catalizată de aceasta se cuplează cu reacțiile catalizate de piruvatkinază (reacție auxiliară) și cu lactatdehidrogenază (ca reacție indicatoare).

$$\text{Creatină + ATP} \xrightarrow{\text{Creatin kinază}} \text{Creatinfosfat + ADP}$$

$$\text{ADP + Fosfoenol piruvat} \xrightarrow{\text{Piruvat kinază}} \text{Piruvat + ATP}$$

$$\text{Piruvat + NADH + H}^+ \xrightarrow{\text{Lactatdehidrogenază}} \text{Lactat + NAD}^+$$

În acest caz, densitatea optică nu se stabilizează după adausul NADH + $H^+$, datorită scindării fosfoenolpiruvatului de către fosfataza alcalină. Activitatea creatinkinazei, corespunde diferenței dintre modificarea extincției probei și martorului.

Pentru a avea o proporționalitate directă între viteza de dispariție a creatinei și formarea $NAD^+$ plecând de la NADH + $H^+$ trebuie să avem în exces următoarele substanțe: ATP, creatina, piruvatkinaza, fosfoenolpiruvatul, lactatdehidrogenaza și NADH + $H^+$.

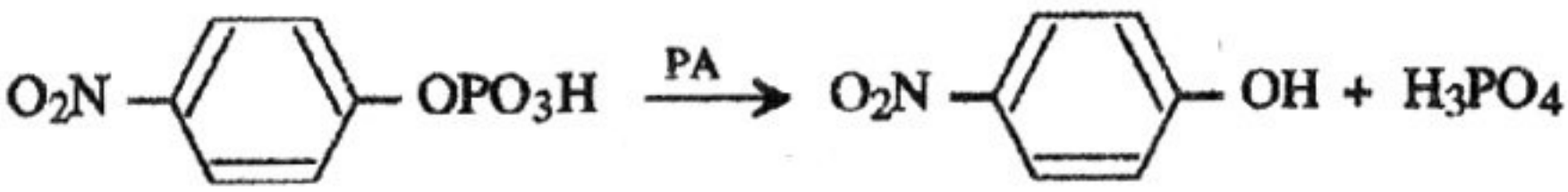
### *VI.2.2.2. METODE CU TIMP FIX DE INCUBARE*

Materialul biologic conținând enzima de analizat se incubează cu o cantitate cunoscută de substrat. După o perioadă fixă de timp se măsoară cantitatea de substrat rămas sau cantitatea de produs ieșit din reacție.

Există o serie de metode pe care le prezentăm în cele ce urmează:

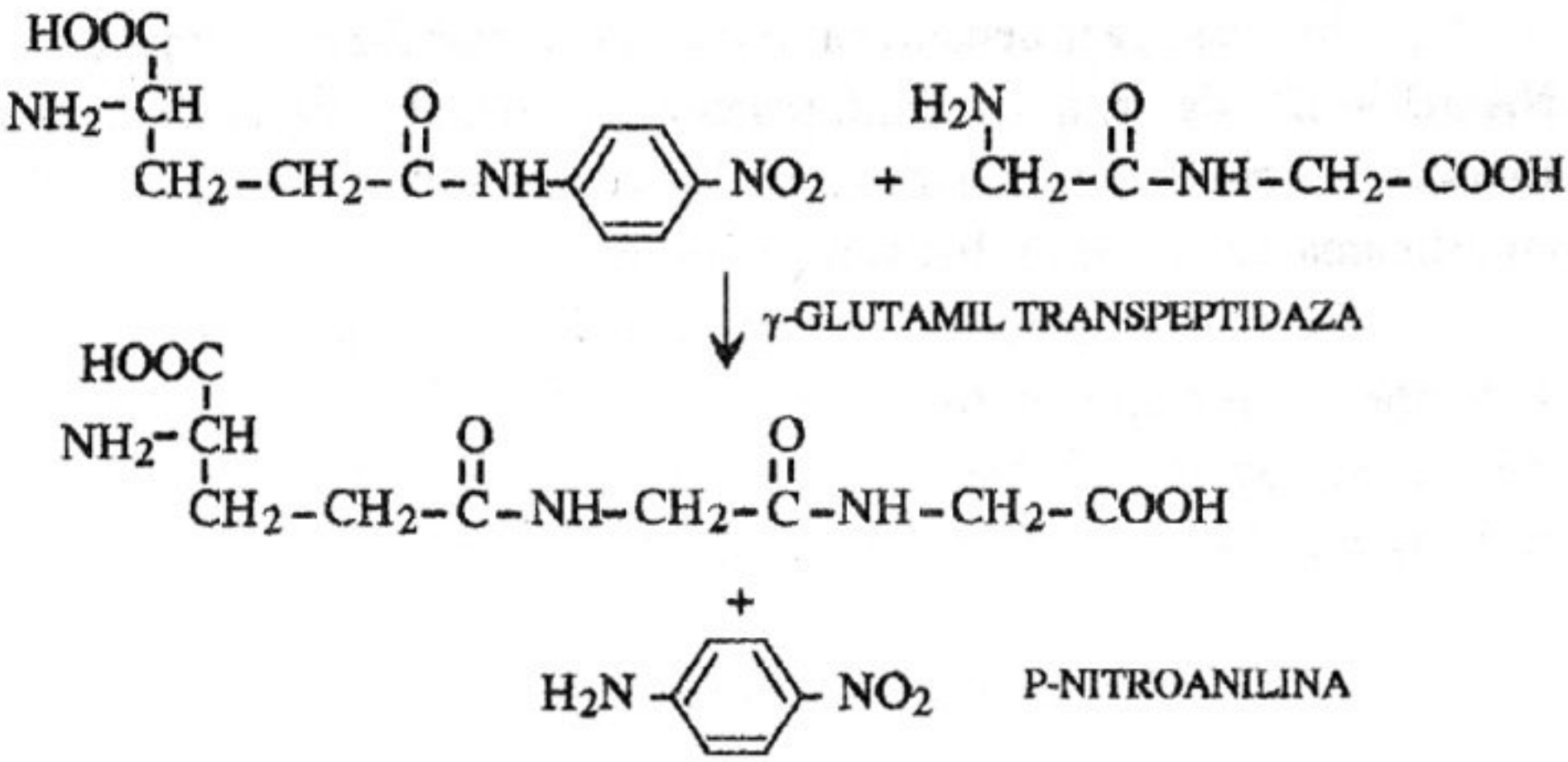
**A. - Metode cu substraturi sintetice**

a) Pentru determinarea activității fosfatazei alcaline și acide se utilizează ca substrat para nitrofenilfosfat (metoda Bessey-Lowry).




b) Pentru determinarea activității γ-glutamil transpeptidazei se folosește ca substrat γ-glutamil-para nitroanilida.

Activitatea γ-glutamil transpeptidazei este direct proporțională cu cantitatea de p-nitroanilină produsă în unitatea de timp, iar aceea a fosfatazelor cu para-nitrofenolul.




B. - **Metode titrimetrice.** Activitatea lipazei serice se apreciază în funcție de numărul de micromoli de acizi grași hidrolizați dintr-o emulsie instabilă de ulei vegetal dozați prin titrare cu o soluție de NaOH (metoda Tietz).

C. - **Metode colorimetrice.** Aceste metode se bazează pe reacția de culoare pe care produșii unei reacții enzimatice o dau cu anumiți reactivi. Astfel, cetoacizii formați sub acțiunea transaminazelor dau reacții de culoare cu 2,4-dinitrofenilhidrazina. De asemenea, triozofosfații formați sub acțiunea aldolazei vor da o reacție de culoare cu 2,4-dinitrofenilhidrazina.

D. - **Metode electroforetice.** Acestea sunt utilizate pentru separarea unor enzime în vederea precizării unui diagnostic. Exemplul clasic îl reprezintă separarea izoenzimelor lactatdehidrogenazei.

Fracționarea în izoenzime s-a putut efectua și în cazul altor enzime, ca de exemplu fosfataza alcalină, fosfataza acidă, amilaza, pseudocolinesteraza.

### *VI.2.3. INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI SUBSTRATULUI ȘI STABILIREA VALORII $K_M$*

Cantitatea de substrat transformată în unitatea de timp servește ca măsură a activității enzimatice. Dacă se măsoară activitatea unei cantități constante de enzimă în funcție de concentrații crescânde de

substrat și se reprezintă grafic variația vitezei de reacție în funcție de concentrația substratului, se obține un arc de hiperbolă ca în figura alăturată.

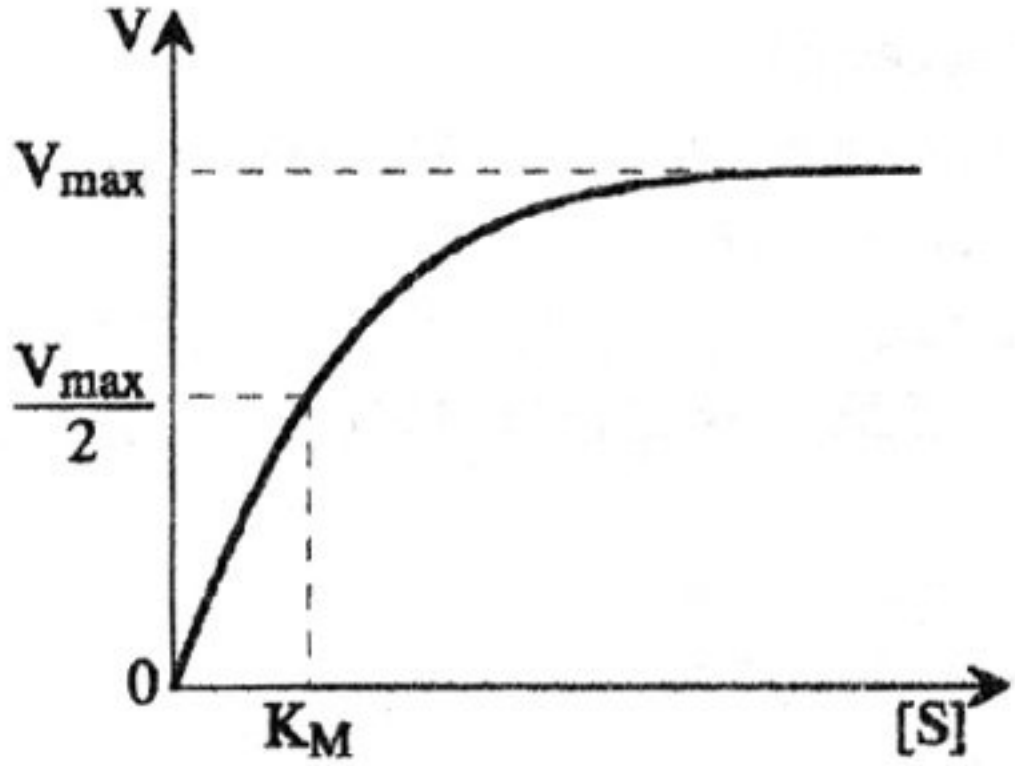



Fig.VI.6. **Variația vitezei de reacție în funcție de concentrația substratului**

Din analiza graficului rezultă că viteza reacției crește odată cu creșterea concentrației de substrat până la o anumită valoare a concentrației substratului de la care viteza rămâne constantă, obținându-se totodată $V_{max}$. Astfel, la concentrații mari de substrat, proporționalitatea între viteza reacției enzimatice și concentrația acestuia nu se mai respectă. Concentrația de substrat la care viteza de reacție este egală cu jumătate din viteza maximă se numește constantă Michaelis Menten ($K_M$). Valoarea $K_M$ definește **afinitatea enzimei** pentru substratul ei: o valoare a $K_M$ mare corespunde unei afinități mici a enzimei.

Cunoscând valoarea $K_M$ se poate stabili concentrația de substrat folosită la determinarea activității enzimei (se alege o concentrație de substrat de 10-100 ori mai mare decât $K_M$).

**Determinarea valorii $K_M$ pentru ureză**

**Principiul metodei** constă în măsurarea vitezei reacției catalizate de o concentrație constantă de ureză, în funcție de concentrații crescânde de substrat. Ureaza catalizează hidroliza ureei în amoniac și $CO_2$:

$$CO(NH_2)_2 \xrightarrow{H_2O} CO_2 + 2NH_3$$

Activitatea enzimei se apreciază prin determinarea cantității de $NH_3$ eliberată.

**Reactivi necesari:**

1. Soluție de uree 1 M și 0,1 M (GM pentru uree = 60)
2. Extract de urează
3. Soluție tampon fosfat 0,1 M, pH = 7,1. Se dizolvă 1,56 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ și 3,582 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ cu apă distilată în balon cotat de 100 ml
4. Soluție $HgCl_2$ 5 g%
5. Soluție HCl 0,05 N
6. Soluție roșu de metil 0,1% în alcool 50%

**Tehnica de lucru.** În 7 pahare Erlenmeyer cu o capacitate de 25 ml se introduc:

| **Reactivi (ml)** | **Martor** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extract urează | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Soluție tampon fosfat | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Apă distilată | 2 | 3 | 2 | 1 | 0 | 3 | 2 |
| Soluție uree 0,1 M | 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | - | - |
| Soluție uree 1 M | - | - | - | - | - | 1 | 2 |
| Soluție $HgCl_2$ | 0,1 | - | - | - | - | - | - |
| Eprubetele se mențin la 37ºC timp de 30 minute | | | | | | | |
| Soluție $HgCl_2$ | - | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Concentrația de uree exprimată în µmoli | 200 | 100 | 200 | 300 | 400 | 1000 | 2000 |

În fiecare pahar se titrează cu HCl 0,05 N cantitatea de $NH_3$ eliberată, folosind ca indicator roșu de metil până la apariția culorii roșu persistent. Din volumul de HCl 0,05 N utilizat la fiecare din cele 6 probe se scade volumul de HCl 0,05 N folosit la titrarea martorului.

Rezultatul reprezintă volumul de HCl necesar neutralizării $NH_3$ din mediul de reacție provenit din uree în urma acțiunii ureazei. Volumele de HCl consumate la titrare servesc la calculul cantității de uree hidrolizate de enzimă.

Viteza reacției catalizate de urează se exprimă în μmoli uree hidrolizată într-un minut. Pentru aceasta se folosește următorul raționament:

1 ml HCl 0,05 N titrează 1 ml $NH_3$ 0,05 N, iar 1000 ml $NH_3$ 0,05 N conține 0,05 echivalenți gram $NH_3$. Egram $NH_3$ = 17 g.

Deci, dacă 1000 ml $NH_3$ 0,05 N ..... 0,05·17 g $NH_3$

1 ml ..... x

---

x = 0,00085 g $NH_3$/ml

Din ecuația reacției rezultă că din:

1 ml uree se eliberează ..... 2 moli $NH_3$, Dacă

60 g uree ..... 2 x 17 g $NH_3$

y ..... 0,00085 g $NH_3$

---

y = 0,0015 g uree

0,0015 g uree eliberează 0,00085 g $NH_3$. Pentru a afla numărul de μmoli din 0,0015 g uree se are în vedere faptul că:

1 μmol uree = 0,00006 g uree. Dacă:

1 μmol ..... 0,00006 g uree

z ..... 0,0015 g

---

z = 25 μmoli uree

De aici rezultă:

1 ml HCl 0,05 N titrează amoniacul rezultat din 25 μmoli uree.

Viteza reacției (V), exprimată în μmoli uree hidrolizată/minut, în fiecare probă în parte se calculează după formula:

$$V = \frac{n \cdot 25}{30} = n \cdot 0{,}833, \text{ unde:}$$

n = ml HCl 0,05 N consumați la titrare;

25 = μmoli uree din care rezultă $NH_3$ titrat la 1 ml HCl 0,05 N

30 = timp de incubare (minute)

Calculul vitezei de reacție pentru cele 6 probe este prezentat în următorul tabel:

| Proba | Conc. substr. uree (μmoli) | Vol. HCl 0,05 N consumat (ml) | Volum corectat (ml) | Viteza de reacție (μmoli/minut) |
|---|---|---|---|---|
| Martor | 200 | $N_0$ | - | - |
| 1 | 100 | $N_1$ | $N_1-N_0 = n_1$ | $V_1=n_1 \cdot 0,833$ |
| 2 | 200 | $N_2$ | $N_2-N_0 = n_2$ | $V_2=n_2 \cdot 0,833$ |
| 3 | 300 | $N_3$ | $N_3-N_0 = n_3$ | $V_3=n_3 \cdot 0,833$ |
| 4 | 400 | $N_4$ | $N_4-N_0 = n_4$ | $V_4=n_4 \cdot 0,833$ |
| 5 | 1000 | $N_5$ | $N_5-N_0 = n_5$ | $V_5=n_5 \cdot 0,833$ |
| 6 | 2000 | $N_6$ | $N_6-N_0 = n_6$ | $V_6=n_6 \cdot 0,833$ |

Datele obținute se reprezintă grafic introducând pe ordonată valoarea vitezei de reacție (μmoli uree/minut) și pe abscisă concentrația substratului (uree). Se analizează curba trasată și se determină grafic valoarea $k_M$.

### *VI.2.4. CLASIFICAREA ENZIMELOR*

Actuala nomenclatură și clasificare a enzimelor se bazează pe principiile și regulile stabilite de Comisia pentru enzime a Uniunii Internaționale de Biochimie.

Pentru clasificarea enzimelor fiecare enzimă are ca identitate un **număr de ordine** și un **nume sistematic.**

Fiecare enzimă posedă un cod, reprezentat prin patru cifre separate prin puncte, care stabilește amplasarea și denumirea în sistemul internațional de clasificare, cod care este precedat de abrevierea E.C. ("Enzyme Comission").

**Prima cifră indică clasa** în care se integrează o anumită enzimă. În funcție de tipul general al reacțiilor chimice pe care le catalizează, enzimele se clasifică în șase clase.

1. Oxidoreductaze
2. Transferaze
3. Hidrolaze
4. Liaze
5. Izomeraze
6. Ligaze

**A doua cifră** indică subclasa care furnizează unele detalii asupra mecanismului de reacție la care participă o anumită enzimă, asupra cărui substrat acționează.

**A treia cifră** indică sub-subclasa care furnizează detalii asupra reacției catalizate de o anumită enzimă, asupra modului de acțiune.

**A patra cifră** indică poziția pe care o deține o enzimă în sub-subclasa respectivă și denumirea sa particulară.

**Numele sistematic** completează codul numeric de clasificare pe care-l deține o anumită enzimă și indică **natura donatorului, natura acceptorului** și **tipul de reacție catalizată**.

## VI.3. ENZIME CU IMPORTANȚĂ DIAGNOSTICĂ

### *VI.3.1. OXIDOREDUCTAZE*

Oxidoreductazele cuprind enzimele care participă la reacțiile de oxido-reducere biologică.

#### *VI.3.1.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII LDH*

Lactatdehidrogenaza (E.C.1.1.1.27.) catalizează reacția de transformare reversibilă a piruvatului în lactat fiind o enzimă prezentă în toate celulele, organele și țesuturile.

**Principiu**

Reacția care stă la baza determinării activității LDH este:

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \underset{\longleftarrow}{\overset{\text{LDH}}{\longrightarrow}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

La pH 7,4, reacția este deplasată în direcția formării lactatului. Se măsoară activitatea LDH din mediile biologice prin determinarea vitezei de reacție a conversiunii piruvatului în lactat și concomitent a NADH + $H^+$ în $NAD^+$. Transformarea se măsoară prin scăderea absorbției din UV corespunzătoare transformării NADH + $H^+$ în $NAD^+$.

**Reactivi necesari**

1. Tampon TRIS-HCl pH 7,4;
2. NADH + $H^+$ soluție 6 mg/ml în tampon TRIS-HCl pH 7,4;
3. Soluție de piruvat de sodiu 3,3 mg/10 ml în tampon TRIS-HCl pH 7,4.

Tabelul VI.4. **VARIAȚII PATOLOGICE ALE LDH**

| Creșteri marcate | Creșteri moderate |
|---|---|
| • infarct miocardic;<br>• necroza toxică a ficatului;<br>• anemia pernicioasă;<br>• leucemii acute;<br>• cancer. | ▪ hepatita virală;<br>▪ invazie tumorală;<br>▪ infarct pulmonar;<br>▪ hemoliză acută;<br>▪ accidente cerebrale. |

**Tehnica de lucru**

Se incubează în cuva spectrofotometrului timp de 5 minute 1,6 ml tampon TRIS-HCl + 0,1 ml NADH + 0,1 ml ser sau extract. Se controlează extincția timp de 1 minut și apoi se declanșează reacția enzimatică adăugând 0,1 ml soluție piruvat de sodiu. Se declanșează cronometrul și se citește extincția la fiecare 30 de secunde. Se calculează scăderea extincției pe timp de 3 minute.

**Calcul**

$U.I = \Delta E_{min} \times 2120$ μmoli/min/litru

Valori normale: 120-200 mU/min/ml ser

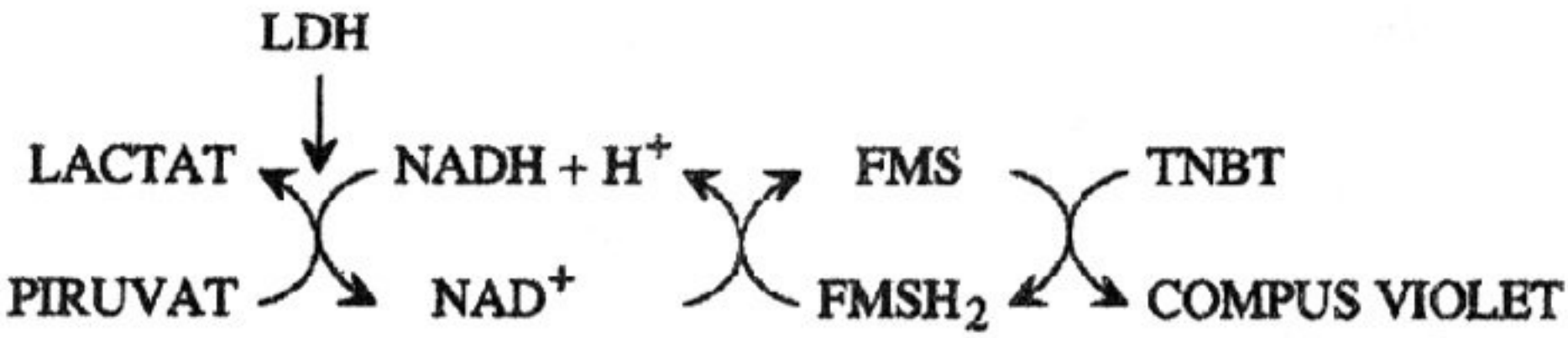
**Determinarea raportului H/M**

**Principiu.** Izoenzimele LDH conținute într-o probă biologică (ser omogenat tisular) se separă în câmp electric (utilizând ca suport gelul de agar, agaroză). Izoenzimele separate reacționează cu substratul (acidul lactic) în prezența coenzimei $NAD^+$, a unui transportor intermediar de electroni și a unui acceptor final de electroni, evidențiindu-se sub forma unor benzi colorate în violet. Intensitatea culorii reflectă gradul de activitate enzimatică.

**Mecanismul de reacție** este următorul:

**FMS** - FENAZIN META SULFAT - colorant cu rol de transportor intermediar de electroni;

**TNBT** - TETRANITRO BLUE TETRAZOLIUM - acceptor final de electroni, care se transformă într-un produs colorat permițând vizualizarea izoenzimelor.




**Evidențierea izoenzimelor LDH.** După efectuarea electroforezei, plăcile se introduc într-o soluție de incubare care conține următoarea proporție de componente:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Lactat de sodiu (substrat) 1 M | = 1 ml | $MgCl_2$ 0,005 M | = 1 ml |
| NADH (10 mg/ml) | = 1 ml | TNBT 1 mg/ml | = 2,5 ml |
| Tampon fosfați 0,5 M ph 7,4 | = 2,5 ml | FMS 1 mg/ml | = 0,25 ml |
| NaCN 0,1 M | = 1 ml | | |

Soluția de incubare nu se expune la lumină. Plăcile de agaroză se incubează în această soluție la întuneric și la 37ºC timp de 60 de minute. După incubare, izoenzimele LDH apar sub formă de 5 benzi violete de intensitate diferită.

**Fixarea.** Plăcile de agaroză pe care s-au relevat izoenzimele se fixează într-o soluție de fixare compusă din alcool etilic 75 ml, acid acetic 5 ml, apă distilată 20 ml. Timpul de fixare variază între 3-24 ore. Plăcile de gel se usucă prin deshidratare acoperindu-se cu hârtie de filtru care trebuie să adere perfect la suprafața gelului. Prin acest procedeu de uscare, gelul care conține izoenzimele etalate se transformă într-o peliculă foarte fină, aderentă la suprafața sticlei. Sub această formă se pot păstra ca document timp îndelungat.

**Evaluarea cantitativă.** Izoenzimele LDH evidențiate electroforetic, se pot evalua cantitativ prin două procedee:

1. Prin **densitometrie** și **planimetrie.** Din curbele obținute se determină activitatea fiecărei izoenzime.

2. Prin **eluție** și estimare colorimetrică după decuparea de pe placă (fără ca gelul să se deshidrateze) a fiecărei benzi colorate (izoenzimă). Calculul procentual pentru fiecare izoenzimă se efectuează în mod identic ca la evaluarea fracțiunilor proteice obținute prin electroforeza pe hârtie.

**Determinarea raportului H/M.** Pentru a putea calcula raportul H/M se ia în considerare structura tetramerică a fiecărei izoenzime LDH.

Se face un tabel cu 2 coloane H și M; valoarea $LDH_1$ ($H_4$) se trece integral în coloana H; valoarea $LDH_2$ ($H_3M$) se împarte la 4 și 3/4 se trec în coloana H, iar 1/4 în coloana M; valoarea $LDH_3$ ($H_2M_2$) se împarte la 2 și 1/2 trece în coloana H, în timp ce 1/2 în coloana M; valoarea $LDH_4$ ($HM_3$) se împarte la 4, 1/4 se trece în coloana H și 3/4 în coloana M; valoarea $LDH_5$ ($M_4$) se trece integral în coloana M.

Însumând cifrele obținute pe verticală se obțin valorile H și M. Se poate calcula apoi raportul H/M.

Studiul izoenzimelor arată o creștere a fracțiunilor $LDH_1$ și $LDH_2$ în afectarea miocardului și a fracțiunilor $LDH_4$ și $LDH_5$ în leziunile hepatice.

### *VI.3.2. TRANSFERAZE*

Enzimele din această clasă catalizează reacții de transfer, prin care o parte din molecula unui substrat numit donor este cedată unui alt substrat numit acceptor.

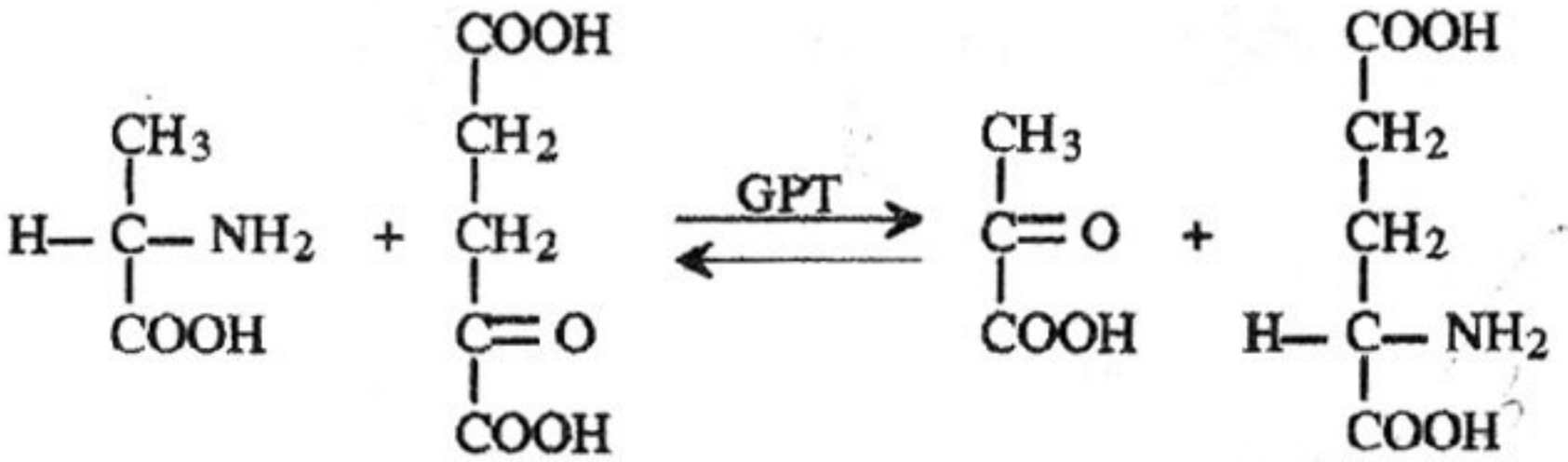
### *VI.3.2.1. TRANSAMINAZELE*

Transaminazele catalizează reacția de transfer a unei grupări amino de la α-aminoacid pe un α-cetoacid.

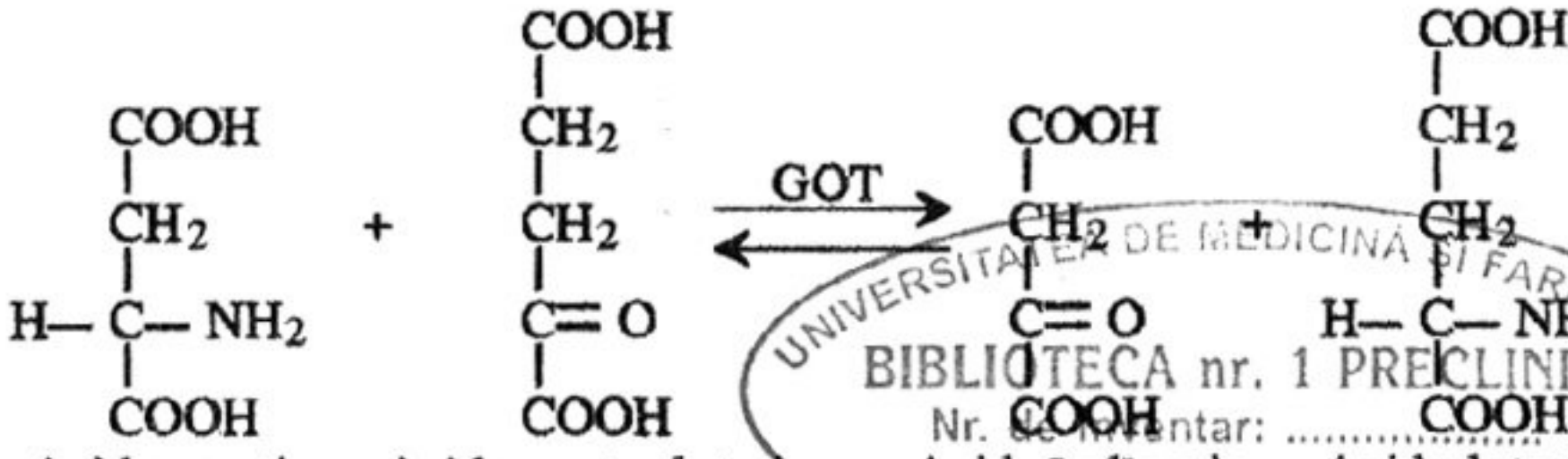
Donatori de grupe **amino** ÷ acidul aspartic și glutamic.

Acceptori de grupe **amino** ÷ acidul piruvic, acidul α-cetoglutaric, acidul oxalilacetic.

1. Transaminaza GPT (glutamat-piruvat-transaminaza) E.C.2.6.1.2. sau ALT (alanin aminotransferaza), TGP (transaminaza glutamic piruvică) catalizează reacția:




2. Transaminaza GOT (glutamat-oxalacetat-transaminaza) E.C.2.6.1.1. sau ASAT (aspartat aminotransferaza), TGO (transaminaza glutamic oxalacetică) catalizează reacția:

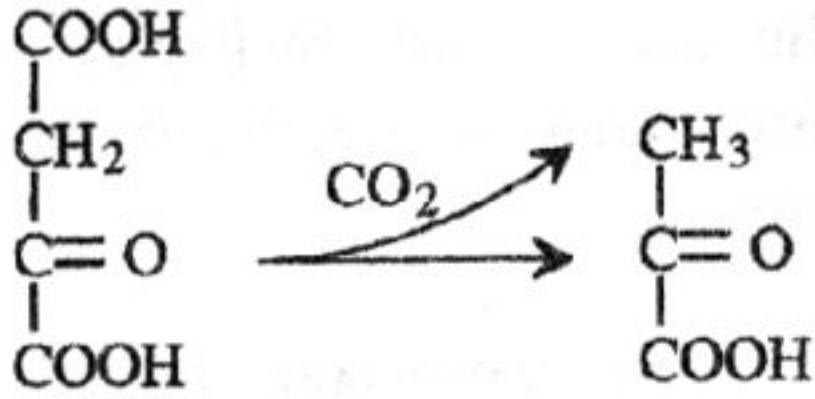



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
BIBLIOTECA nr. 1 PRECLINIC
Nr. de inventar: 1652
CRAIOVA
I 76.469



RMF 4/2000

Acidul oxalacetic se decarboxilază spontan:




Repartizarea tisulară a celor două transaminaze este cantitativ diferită la nivelul diverselor organe.

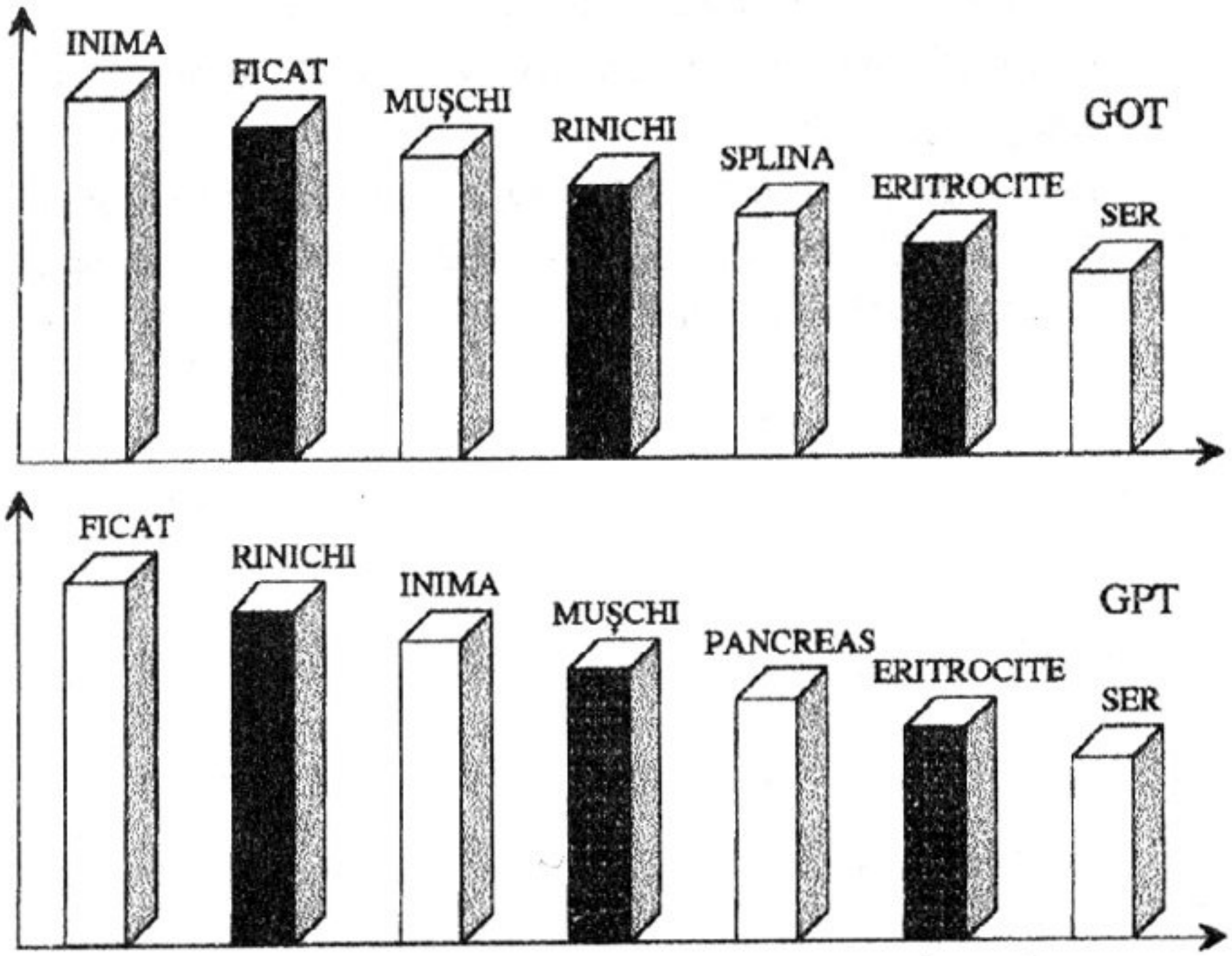
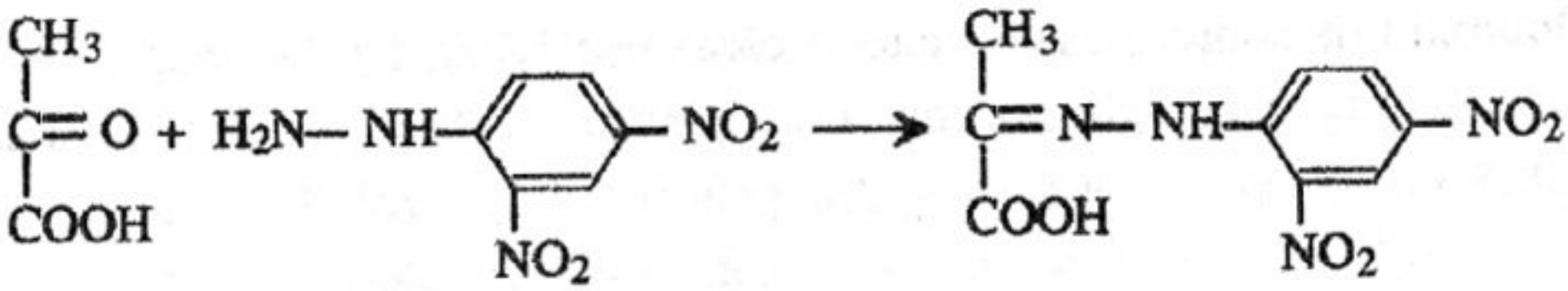



Fig.VI.7. **Repartiția tisulară a transaminazelor**

**Principiul metodei**

Acidul piruvic rezultat în urma acțiunii catalitice a ambelor enzime reacționează cu 2,4-dinitrofenilhidrazină (2,4 DNFH) în mediu alcalin și formează 2,4-dinitrofenilhidrazonă de culoare roșie, care se estimează colorimetric; intensitatea coloratiei este proporțională cu activitatea enzimei.



**Reactivi**

◆ Tampon TRIS: soluție stoc A. - 0,2 M TRIS: 24,2 g TRIS se dizolvă în 1000 ml apă distilată. B. - HCl 0,2 M.

Pentru obținerea soluției tampon pH = 7,5 se amestecă 50 ml soluție A cu 41,4 ml soluție B și se completează la 200 ml cu apă distilată.

Notă: În locul tamponului TRIS se poate folosi și 100 ml tampon fosfat pH = 7,5: se dizolvă 15 g $K_2HPO_4$ (sau 19,5 g $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$) și 2 g $KH_2PO_4$ în 900 ml apă. Se verifică pH-ul și se ajustează la nevoie, se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se adaugă 3 ml cloroform, se scutură bine și se păstrează la rece.

◆ **Substrat GOT** - acid aspartic 100 mM și acid α-cetogluteric 2 mM: se cântăresc 1,331 g acid aspartic într-un pahar; se adaugă 29 mg acid α-cetoglutaric (cântărit separat și reluat în pahar cu 50 ml tampon) se adaugă apoi hidroxid de sodiu 2 N, câte puțin însă, amestecând continuu; după adăugarea hidroxidului de sodiu până la pH aproximativ 7,5 se lasă să se dizolve, amestecând și verificând pH-ul din timp în timp (în caz că se reacidifică se mai adaugă NaOH cu picătura, menținându-se un pH de 7,4-7,5). Când s-a dizolvat complet (durează circa o oră) se ajustează definitiv la pH 7,5, se trece în balon cotat de 100 ml și se aduce la semn cu tampon.

◆ **Substrat GPT** - alanină 200 mM și acid α-cetoglutaric 2 mM. Se cântăresc 1,782 g L-(sau DL)-alanină într-un pahar; se adaugă 29 mg acid α-cetoglutaric și 50 ml tampon. Se dizolvă amestecând, se verifică pH-ul și se ajustează la pH 7,5 cu hidroxid de sodiu 2N (cu picătura). Se trece în balon cotat la 100 ml și se aduce la semn cu tampon.

Este avantajos să se utilizeze **aspartat de sodiu** și **cetoglutarat de sodiu** în locul acizilor respectivi, deoarece sărurile de sodiu sunt mai solubile și nu mai este nevoie dee neutralizare cu

hidroxid de sodiu. În acest caz se cântăresc 1,791 g L-aspartat de sodiu și 38,5 mg α-cetoglutarat de sodiu pentru GOT și 1,782 g alanină și 38,5 mg α-cetoglutarat de sodiu pentru GPT, dizolvându-se direct în câte 100 ml tampon. Ambele substanțe se păstrează în frigider, adăugându-se câte trei ml de cloroform în flacon și agitând energic. În aceste condiții conservarea este bună.

• **2,4 Dinitrofenilhidrazină** 1 mM. Se dizolvă 19,8 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazină în 10 ml acid clorhidric concentrat. După solvire completă se aduce la 100 ml cu apă distilată. Se conservă la temperatura camerei.

• **Hidroxid de sodiu,** 0,4 N; 6. **Standard: piruvat de sodiu 2 mM.** Se dizolvă 22 mg piruvat de sodiu în 100 ml tampon. Se adaugă 0,3 ml cloroform și se agită bine. Se păstrează în frigider două săptămâni.

**Tehnica de lucru**

Se pipetează probele (P), un standard (S) și un blanc (B).

| Reactivi | GOT | | | GPT | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | P | S | B | P | S | B |
| Substrat GOT | 0,5 | 0,5 | 0,5 | - | - | - |
| Substrat GPT | - | - | - | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Se lasă 5 minute la 37ºC | | | | | | |
| Ser | 0,1 | - | - | 0,1 | - | - |
| Standard | - | 0,1 | - | - | 0,1 | - |
| Se incubează la 37ºC | 60 minute | | | 30 minute | | |
| 2,4 dinitrofenilhidrazină | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Se lasă 20 minute la temperatura camerei | | | | | | |
| Hidroxid de sodiu 0,4 N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

După 5 minute se măsoară extincția probelor (EP) și a standardului (S) față de blancul B; la **520 nm,** în cuve de 1 cm.

Tabel VI.5. **ECHIVALENTUL TRANSAMINAZELOR ÎN UI**

| μU/min/l | mU/ml | | μM/min/l | mU/ml |
|---|---|---|---|---|
| **GOT sau GPT** | **GOT** | **GPT** | **GPT** | **GPT** |
| 2 | 2 | 1 | 56 | 24 |
| 4 | 3 | 2 | 58 | 25 |
| 6 | 5 | 2,5 | 60 | 26 |
| 8 | 6 | 3 | 62 | 27 |
| 10 | 7 | 4 | 64 | 29 |
| 12 | 9 | 4,5 | 66 | 30 |
| 14 | 11 | 5 | 68 | 31 |
| 16 | 13 | 6 | 70 | 33 |
| 18 | 15 | 7 | 72 | 34 |
| 20 | 17 | 2,5 | 74 | 35 |
| 22 | 19 | 8 | 76 | 36 |
| 24 | 21 | 9 | 78 | 37 |
| 26 | 23 | 9,5 | 80 | 38 |
| 28 | 25 | 10 | 82 | 39 |
| 30 | 27 | 11 | 84 | 40 |
| 32 | 29 | 12 | 86 | 42 |
| 34 | 31 | 13 | 88 | 44 |
| 36 | 33 | 14 | 90 | 46 |
| 38 | 35 | 15 | 92 | 48 |
| 40 | 37 | 16 | 94 | 50 |
| 42 | 39 | 17 | 96 | 52 |
| 44 | 41 | 18 | 98 | 54 |
| 46 | 44 | 19 | 100 | 56 |
| 48 | 47 | 20 | 102 | 60 |
| 50 | 51 | 21 | - | - |
| 52 | 55 | 22 | - | - |
| 54 | 60 | 23 | - | - |

**Calcul.** Se calculează formarea acidului piruvic: **X** (în μmoli/min./l).

$$\text{Pentru GOT: } X = EP/ESx2x10^3x1/60 = \frac{E_P}{E_S} \text{ x } 33{,}33$$

$$\text{Pentru GPT: } X = EP/ESx2x10^3x1/30 = \frac{E_P}{E_S} \text{ x } 66{,}66$$

Se obține activitatea în **unități internaționale** (μmoli/min/l 25ºC) căutând în tabelele de corecție echivalentul în UI al valorii X obținute:

**Observații.**

1. Dacă activitatea enzimatică depășește 60 UI se va repeta determinarea cu incubare scurtă: 20 minute pentru GOT și 10 minute pentru GPT. Rezultatele obținute se înmulțesc cu 3.

2. Sticlăria utilizată trebuie să fie în perfectă stare de curățenie, spălată final cu multă apă distilată, deoarece urmele de detergenți pot inhiba activitatea enzimatică.

Tabel VI.6 - **VARIAȚII FIZIOPATOLOGICE ALE TRANSAMINAZELOR**

| GOT | Valori normale | GPT |
|---|---|---|
| 2-16 UI | | 2-12 UI |
| **Variații patologice** | | |
| **Valori crescute GOT** | | **Valori crescute GPT** |
| **A. Creșteri marcate**<br>- infarct miocardic<br>- hepatită virală acută<br>- necroză toxică a ficatului | | **A. Creșteri marcate**<br>- hepatită virală<br>- necroză toxică a ficatului |
| **B. Creșteri moderate**<br>- hepatite cronice<br>- ciroze<br>- traumatisme<br>- anemii hemolitice<br>- monucleoza infecțioasă<br>- embolii cerebrale | | **B. Creșteri moderate**<br>- hepatite cronice<br>- ciroze<br>- icter mecanic<br>- ficatul de stază cardiacă acută<br>- tumori pancreatice |

## *VI.3.2.2. γ- GLUTAMIL TRANSFERAZA*

**Principiu**

γ-glutamil transferaza sau γ-glutamil transpeptidaza (EC.2.3.2.2.) catalizează transferul acidului glutamic de pe un donor (γ–glutamil-p-nitroanilidă) pe un acceptor (glicil-glicină). În urma reacției se formează p-nitroanilina colorată galben.

**Reactivi**

1. Substrat sub formă de comprimate, fiecare comprimat servind la 5 determinări în sistemul cinetic sau la determinările în sistemul static;

2. Tampon TRIS-HCl;

3. - Acid acetic..N.

Pregătirea soluției de substrat. La 1,5 ml soluție TRIS-HCl se adaugă 6,5 ml apă. Amestecul se încălzește la 45-50ºC pe baia de apă după care se introduce 1 comprimat a cărui dizolvare are loc la mai puțin de 1 minut. Ssoluția poate fi păstrată la 25ºC timp de 24 ore sau la 4ºC timp de 4 zile.

Serul de analizat nehemolizat, poate fi utilizat într-un interval de o săptămână de la data recoltării cu condiția să fie păstrat la 4°.

**Tehnica de lucru**

a. **Testul cinetic:** în cuva de 1 cm a spectrofotometrului se pipetează 1,5 ml soluție substrat în TRIS-HCl și 0,1 ml ser. Atât substratul cât și serul trebuie preîncălzite la 25ºC. După exact 1 minut de la amestecare se citește extincția la 405 nm, față de apă (se poate reduce diferența de extincție când aceasta este mai mare de 0,6 adăugând în cuva martor 1-2 picături soluție acid picric 1%). Se repetă citirile la intervale de 1 minut timp de alte trei minute. Se calculează valoarea medie ΔE/min.

b. **Testul static:** Pentru fiecare determinare se pregătesc 2 tuburi de hemoliză în care se pipetează:

Tabelul VI.7.

| Reactivi | Martor (M) | Probă(P) |
|---|---|---|
| Substrat în TRIS-HCl | 0,3 | 0,3 |
| Ser | - | 0,02 |
| Se incubează amestecul la 25ºC timp de 20 de minute, apoi se pipetează: | | |
| Acid acetic 1 N | 1,5 | 1,5 |
| Ser | 0,02 | - |

Se citește extincția probei față de martor la 405 nm în maximum o oră de la adăugarea ultimului reactiv.

**Calculul activităților γ-GT**

1. UI γ-GT este cantitatea de enzimă care catalizează transferul a 1 μmol acid glutamic de pe donor pe acceptor la temperatura de 25ºC, în timp de 1 minut. Activitatea enzimei serice se exprimă în U/L.

Test cinetic: γ-GT (U/L) = 1616 x $\Delta E_{405}$/minut

Test static: γ-GT (U/L) = 410 x $\Delta E_{405}$/20 minute

**Valori normale:** 6-28 U/L la bărbați, 4-18 U/L la femei.

**Valoarea diagnostică:** γ-GT este un test deosebit de sensibil de retenție biliară, fără a prezenta modificări în leziunile osoase. Valori crescute se întâlnesc și în hepatite cronice, neoplasm primitiv sau metastatic al ficatului, insuficiență cardiacă cu stază hepatică sau în leziuni pancreatice. De asemenea, γ-GT crește la alcoolici sau după administrare de barbiturice.

### *VI.3.3. HIDROLAZE*

Clasa hidrolazelor cuprinde enzimele care scindează diferitele substanțe prin intermediul componentelor apei. Din această clasă fac parte enzimele care hidrolizează proteinele până la aminoacizi, polizaharidele până la monozaharide, triacilglicerolii până la acizi grași și glicerină.

## *VI.3.3.1. AMILAZA*

### *VI.3.3.1.1. GENERALITĂȚI. IMPORTANȚA FIZIOPATOLOGICĂ*

α-amilaza (α-1,4-glucan-4-glucanohidrolaza - E.C.3.2.1.1.) este o enzimă capabilă să depolimerizeze amidonul până la maltoză, dizaharid ce reprezintă termenul final al acțiunii amilazei. Hidroliza se face trecându-se succesiv prin amilo, -eritro-și acrodextrine, compuși cu greutate moleculară din ce în ce mai mică și care în prezența soluției Lugol se colorează succesiv în albastru, roșu sau rămân necolorați.

Activitatea amilazică a lichidelor biologice se apreciază în funcție de intensitatea hidrolizei amidonului, și anume fie lucrându-se în diluții succesive de ser sau urină și cu o cantitate fixă de substrat (metoda Wohlgemuth), fie cu un volum fix de ser/urină în prezența unei soluții de substrat aflat în exces, determinându-se cantitatea de substrat rămas nehidrolizat după un timp dat (metoda Richterich, Phadebas etc.).

Numeroase cercetări au demonstrat că măsurarea excreției urinare de amilază este un indice foarte sensibil în caracterizarea pancreatitelor acute.

A fost subliniată, de asemenea, valoarea clinică a raportului clearance de amilază/clearance de creatinină în diagnosticul pancreatitelor acute.

Acest raport derivă din formula clearanceului:

$$C = \frac{U \times V}{P} \times T, \text{ unde}$$

C = clearance, U = concentrația urinară a unui component; P = concentrația plasmatică al aceluiași component; V = volumul urinar; T = timpul.

Clearanceul amilazei (Cam) este dat de formula:

$$Cam = \frac{\text{Amilazuria x Volumul urinar}}{\text{Amilazemia}} \text{ x T}$$

Clearanceul creatinină (Ccr) este dat de formula:

$$Ccr = \frac{\text{Creatiminuria x Volumul urinar}}{\text{Creatininemia}} \text{ x T}$$

$$\frac{Cam}{Ccr} = \frac{\frac{\text{Amilazuria x Volumul urinar}}{\text{Amilazemia}} \text{ x T}}{\frac{\text{Creatiminuria x Volumul urinar}}{\text{Creatininemia}} \text{ x T}}$$

$$\frac{Cam}{Ccr}\% = \frac{\text{Amilazuria}}{\text{Amilazemia}} \text{ x } \frac{\text{Creatininemia}}{\text{Creatininuria}} \text{ x } 100$$

$$\frac{Cam}{Ccr}\% = 1\text{-}4\%$$

Raport în pancreatite acute: 6,6-14,5%.

### *VI.3.3.1.2. METODA RICHTERICH*

**Principiu**

Se determină intensitatea culorii date în prezența iodului de către amidonul rămas nehidrolizat sub acțiunea amilazei.

**Reactivi**

1. **Substrat:** soluție de amidon 6,2 mM: se dizolvă la cald 0,25 g amidon în 250 ml soluție tampon TRIS pH 7,5;

2. **Tampon TRIS**-HCl pH 7,5;

3. **Iod - iodură de potasiu:** se solvă 1,8 g iodură de potasiu și 0,18 g iod în 100 ml apă;

4. **Substrat tampon** 3,1 mM; se amestecă volume egale de substrat și tampon;

5. **Acid clorhidric** 0,5N.

Soluție de iod-iodură se diluează la întrebuințare, 1/200 cu apă.

| Reactivi | Probă | Martor |
|---|---|---|
| Substrat tampon | 1 | 1 |
| HCl 0,5 N | - | 0,5 |
| Se menține 5 minute la 37ºC0,5 | | |
| Ser sau urină | 0,02 | 0,02 |
| Incubare 30 minute la 37ºC | | |
| HCl 0,5 N | 0,5 | - |
| Iod diluat 1/200 | 10 | 10 |

După 10 minute se măsoară extincția probelor Ep și a martorului $E_M$ la 570 nm, față de apă.

**Calcul:** Concentrația substratului fiind 3,1 mM la un timp de incubare de 30 minute, la un volum de referință de 1000 ml, iar volumul probei fiind de 0,02 ml, atunci μmoli/min./litru amidon hidrolizat se va calcula astfel:

$$\frac{E_M - E_P}{E_M} \quad 5166 = \text{UI activitate amilazică}$$

### *VI.3.3.1.3. METODA PHADEBAS*

**Phadebas amilase** test este o nouă metodă simplă dar în același timp sensibilă și precisă, pentru a determina activitatea α-amilazei în ser, urină, extracte biologice și extracte tisulare.

Substratul este un polimer al albastrului de amidon cu legături ramificate, insolubil în apă și care se prezintă sub formă de comprimate. α-amilaza hidrolizează acest polimer în fragmente de albastru de

amidon solubil în apă. Absorbția soluției este în funcția de activitatea α-amilazică a probelor de analizat.

**Tehnica de lucru**

În două eprubete de centrifugă pentru P (probă) și B(blanc) se introduc următoarele:

| Reactivi | Probă | Blanc |
|---|---|---|
| Ser, extract | 0,2 | - |
| Apă distilată | 4 | 4,2 |
| Preincubare 5 minute la 37ºC | | |
| Se introduce un comprimat de albastru de amidon în fiecare tub | | |
| Se agită energic eprubetele timp de 10 minute, folosind un FINGERS-STAILS | | |
| Incubare exact 15 minute la 37ºC | | |
| NaOH 0,5 N | 1 | 1 |
| Centrifugare timp de 5 minute la 1500 rot/min | | |

Se citește absorbția supernatantului bleu clar la 620 nm, în cuva cu drum optic de 1 cm.

**Calcul:** $E_P$-$E_B$ = E. Extincția E se integrează în curba de etalonare aflând nivelul α-amilazei în U/litru extract.

Valorile normale ale activității α amilazei sunt diferite, în funcție de metoda de dozare (vezi tabelul VI.7.)

Tabel VI.8. **VALORILE NORMALE ALE ACTIVITĂȚII α-AMILAZEI**

| Material biologic | Metoda Wohlgemuth UW/ml | Metoda Richterich U/l | Metoda Phadebas UPh/l | nKat/l |
|---|---|---|---|---|
| Ser adulți | 16-32 | 230-2700 | 70-300 | 1170-5000 |
| Urină adulți | 16-64 | -5500 | 100-2000 | 1670-33500 |

**Variații patologice**

Cauzele hiperamilazemiei, respectiv hiperamilazuriei sunt clasificate în trei categorii (vezi tabelul VI.8.).

Tabel VI.9. **VARIAȚIILE PATOLOGICE ALE α-AMILAZEI**

| **I. Afecțiuni pancreatice** | **II. Afecțiuni nepancreatice** |
|---|---|
| • pancreatite acute, cronice<br>• carcinom pancreatic<br>• traumatisme pancreatice | ▪ insuficiență renală<br>▪ hiperamilazemia tip salivară<br>▪ leziuni ale glandei salivare<br>▪ macroamilazemia |
| **III. Afecțiuni cu origine complexă** | |
| ◆ afecțiuni ale tractului biliar<br>◆ afecțiuni intraabdominale altele decât pancreatite (obstrucție intestinală, peritonite, apendicite acute)<br>◆ traume cerebrale ◆ pneumonii<br>◆ afecțiuni ale prostatei ◆ acidoza diabetică | |

### *VI. 3.3.2. FOSFATAZELE*

Fosfatazele sunt monoesteraze care scindează hidrolitic esterii acidului ortofosforic și se disting fosfataze specifice și nespecifice. Fosfatazele specifice hidrolizează anumiți esteri fosforici (ATP-aza scindează ATP-ul), iar fosfatazele **nespecifice** hidrolizează acidul ortofosforic din cele mai diferite substanțe organice: α-glicero fosfat, p-nitrofenil fosfat etc.)

Se deosebesc două grupuri de fosfataze nespecifice care diferă prin pH-urile lor optime de acțiune.

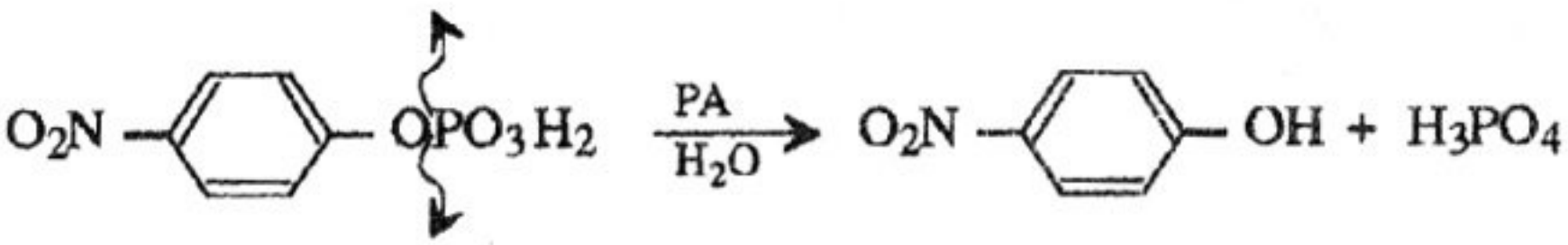
**Fosfatazele alcaline** acționează optim la un pH = 8,5-10 și constituie un grup de enzime din care fac parte fosfataza alcalină osoasă produsă în **osteoblaști** (dar nu și în osteoclaști), fosfataza alcalină hepatică produsă în celulele **hepatice** și ale **canaliculelor biliare,** precum și cele produse în **intestin, rinichi** și **placentă**, dar în cantitate mai mică.

**Fosfatazele acide** acționează optim la un pH = 4,5-5 și sunt conținute în cantități mari în **prostată** și în cantități mult mai mici în **eritrocite, plăcuțe sanguine, ficat și oase.** Fosfataza acidă prostatică este inhibată în mod selectiv de L-tartrat și este mult crescută în carcinomul de prostată.

### *VI.3.3.2.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ALCALINE CU PARANITROFENIL FOSFAT (METODA BESSEY - LOWRY)*

**Principiu**

Fosfataza alcalină (E.C.3.1.3.1.) serică hidrolizează para-nitrofenilfosfatul la acid fosforic și p-nitrofenol. În mediu alcalin, p-nitrofenolul este intens colorat în galben și prezintă un maximum de absorbție la 405 nm. Activitatea enzimei este proporțională cu intensitatea culorii p-nitrofenolului eliberat care se determină spectrofotometric.




**Reactivi:**

1. Soluție tampon pH 7,5 (glicină 100 mM + $Mg^{2+}$ 2mM):

- glicină 1,5 g
- sulfat de magneziu 60 mg

Se aduce pH-ul la 10,5 cu hidroxid de sodiu 0,1 N

- apă distilată 200 ml

Se păstrează la rece.

2. p-nitrofenilfosfat 15,2 mM

- p-nitrofenilfosfat 40 mg
- apă distilată 10 ml

3. Soluție substrat de p-nitrofenilfosfat 3,8 mM

- p-nitrofenilfosfat 15,2 M 1 vol
- soluție tampon cu pH 10,5 3 vol

4. Hidroxid de sodiu 0,1 N

5. Soluție standard stoc de p-nitrofenol 20 mM

- p-nitrofenol 278,2 mg
- apă distilată 100 ml

6. Soluție standard de lucru p-nitrofenol 2 mM

- soluție standard stoc 1 ml
- apă distilată 10 ml

**Tehnică.** În trei eprubete se pregătesc: proba de analizat (P), proba martor (B) și proba standard (S).

| Reactivi | P | B | S |
|---|---|---|---|
| Soluție substrat | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Se incubează 5 minute la 37ºC | | | |
| Ser | 0,1 | - | - |
| Soluție standard de lucru | - | - | 0,1 |
| Se incubează 30 minute la 37ºC | | | |
| Hidroxid de sodiu 0,1 N | 10 | 10 | 10 |
| Ser | - | 0,1 | - |

Se măsoară densitățile optice ale probelor respective la 405 nm față de apă, în cuve de 1 cm și se notează cu EP, EB, ES etc.

**Calcul.** În cazul determinării spectrofotometrice nu mai este necesar să se efectueze proba standard.

Activitatea enzimei se va exprima în µmoli p-nitrofenol/min/litru, după următoarea formulă:

$$\frac{EP-EB}{18,530} \cdot \frac{12,6}{0,1} \cdot \frac{1}{30} \cdot 10^6 = \mu\text{moli p-nitrofenol/min/l}$$

în care: $18,53 \cdot 10^3$ reprezintă coeficientul de absorbție molar p-nitrofenolului alcalin la 405 nm; 0,1 ml - volumul probei de analizat; 12,6 ml - volumul final; 30 min - timp de incubare.

Exprimarea activității se face în UI.

Deci (EP - EB) x 227 = UI activitate fosfatază alcalină.

### *VI.3.3.2.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ACIDE (METODA BESSEY-LOWRY)*

**Principiu.** Prezintă interes clinic deosebit fosfataza acidă prostatică și fosfataza acidă totală. Fosfataza prostatică se diferențiază de fosfatazele neprostatice prin proprietatea specifică fosfatazei prostatice de a fi inhibată selectiv de L-tartrat. Se determină în paralel activitatea fosfatazică acidă totală, în absența tartratului și activitatea fosfatazică neprostatică, în prezența tartratului. Diferența dintre fosfataza acidă totală și fosfataza neprostatică reprezintă activitatea fosfatazei prostatice.

**Fosfataza acidă (E.C.3.1.3.2.)** se determină după același principiu enunțat la fosfataza alcalină.

**Reactivi.**

1. Soluție tampon de citrat 90 mM cu pH 4,9:
- acid citric 1,9 g
- apă distilată 70 ml

Se aduce la pH 4,9 cu NaOH 1 N
- apă distilată 100 ml

Se păstrează la rece.

2. Soluție tartrat 60 mM
- L-tartrat monosodic 1,15 g
- apă distilată 100 ml

Se conservă la rece.

3. Soluție p-nitrofenilfosfat 12,5 mM
- p-nitrofenilfosfat 40 mg
- apă distilată 10 ml

Se prepară la nevoie.

4. Soluție substrat 7,6 mM cu pH 4,9
- soluție p-nitrofenilfosfat 12,5 mM 1 vol
- soluție tampon cu pH 4,9 1 vol

5. Hidroxid de sodiu 0,1 N

6. Soluție standard stoc 20 mM de p-nitrofenol
- p-nitrofenol 278,2 mg

- apă distilată 100 ml

Se conservă la rece.

7. Soluție standard de lucru 0,2 mM

- se diluează soluția standard stoc 20 mM de p-nitrofenol 1/100.

Se prepară la nevoie.

**Tehnică.** Pentru fiecare analiză spectrofotometrică se lucrează o probă pentru fosfataza totală (PT), fosfataza neprostatică (PNP) și o probă martor (B). Când se folosește fotometru cu filtre se pregătește și o probă standard (S). Se va lucra după indicațiile ce urmează:

| | PT | PNP | B | S |
|---|---|---|---|---|
| Soluție substrat 7,6 mM pH 4,9 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Soluție tartrat 60 mM | - | 0,1 | - | - |
| Apă distilată | 0,1 | - | 0,1 | 0,1 |
| Se incubează 5 minute la 37ºC | | | | |
| Ser | 0,1 | 0,1 | - | - |
| Soluție standard de lucru 0,2 mM | - | - | - | 0,1 |
| Se incubează 30 minute la 37ºC | | | | |
| Hidroxid de sodiu 0,1 N | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| ser | - | - | 0,1 | - |

Se măsoară densitățile optice ale fiecărei probe față de apă la 405 nm, în cuve de 1 cm și se notează ET, ENP, EB și ES.

**Calcul.** În cazul determinării spectrofotometrice (fără standard), activitatea fosfatazică acidă totală se exprimă fie în µmoli p-nitrofenol/min/l, fie în UI după următoarea formulă:

$$\frac{ET-EB}{18,530} \cdot \frac{3,2}{0,1} \cdot \frac{1}{30} \cdot 10^6 = \mu\text{moli p-nitrofenol/min/l}$$

deci:

(ET - EB)·57,5 = UI de activitate fosfatazică acidă totală.

unde $18,53 \cdot 10^3$ reprezintă coeficientul de absorbție molar al p-nitrofenolului la 405 nm; 0,1 ml - volumul probei de analizat; 3,2 ml - volumul final al probei de analizat; 30 min - timp de incubare.

(ENP - EB) x 57,5 = UI de activitate fosfatazică acidă neprostatică

Activitatea fosfatazei prostatice va fi:

UI foisfataza acidă totală - UI fosfataza neprostatică = UI fosfataza prostatică

În cazul folosirii fotometrului cu filtru, soluția standard de lucru fiind în concentrație de 0,2 mM, formula de calcul devine:

$$\frac{ET-EB}{ES} \cdot 0,0002 \cdot \frac{1}{30} \cdot 10^6 = \mu\text{moli p-nitrofenol/min/l}$$

Deci: $\frac{ET-EB}{ES} \cdot 6,67$ = UI activitate fosfatazică acidă totală

și $\frac{ENP-EB}{ES} \cdot 6,67$ = UI activitate fosfatazică acidă neprostatică

Prin diferența între UI activitate fosfatazică acidă totală și UI activitate fosfatazică neprostatică se obține activitatea fosfatazei prostatice în UI.

Tabelul VI.10. **VALORILE NORMALE ALE FOSFATAZELOR SERICE**

| | **Fosfataza alcalină** | **nKat/l** | **U/l** | **Metoda** |
|---|---|---|---|---|
| Ser | adulți | 333-800 | 20-48 | Paranitrofosfat |
| | copii 2-15 ani | 633-2300 | 38-138 | disodic |
| | **Fosfataza acidă** | **nKat/l** | **U/l** | **Metoda** |
| Ser | adulți | 80-225 | 4,8-13,5 | Paranitrofenil |
| | copii | 130-353 | 7,8-21,2 | fosfat |
| | Fosfataza prostatică | | | |
| | adulți | -62 | -3,7 | |

după Radu Mihai Vasile - Sistemul internațional de unități în medicină. Editura Medicală București, 1986.

Determinările de fosfatază alcalină efectuate în clinică măsoară o sumă a activității mai multor izoenzime de proveniență hepatică, osoasă, renală și cele eliberate din peretele intestinal. La femei pot proveni și din glanda mamară sau placentă.

Tabelul VI.10. **VARIAȚIILE PATOLOGICEALE FOSFATAZELOR ALCALINE ȘI ACIDE SERICE**

| Fosfataza alcalină | Fosfataza acidă |
|---|---|
| **A. Creșteri** | **A. Creșteri** |
| • rahitism | • carcinomul de prostată |
| • osteomalacie | • boala lui Paget |
| • colestaze | • neoplasme ale glandei mamare |
| • hiperparatiroidism | • metastaze osoase |
| • ictere prin retenție | • trombocitemii |
| • boala lui Paget | |
| • sarcom osteogenic | |
| • metastaze osoase | |
| **B. Scăderi** | |
| • deficit de vitamina C | |
| • hipofosfatazie | |

Fosfatazele alcaline se elimină prin bilă, cu excepția fosfatazei alcaline osoase cu rol în formarea țesutului osos care, având masă moleculară mare, nu se elimină prin bilă, fiind probabil catabolizată în celulele sistemului macrofagic. De aceea, creșterile activității fosfatazei alcaline serice nu se datoresc imposibilității de eliminare a fosfatazei alcaline și retenției unei fosfataze alcaline secretate de celulele ce mărginesc ductele biliare.

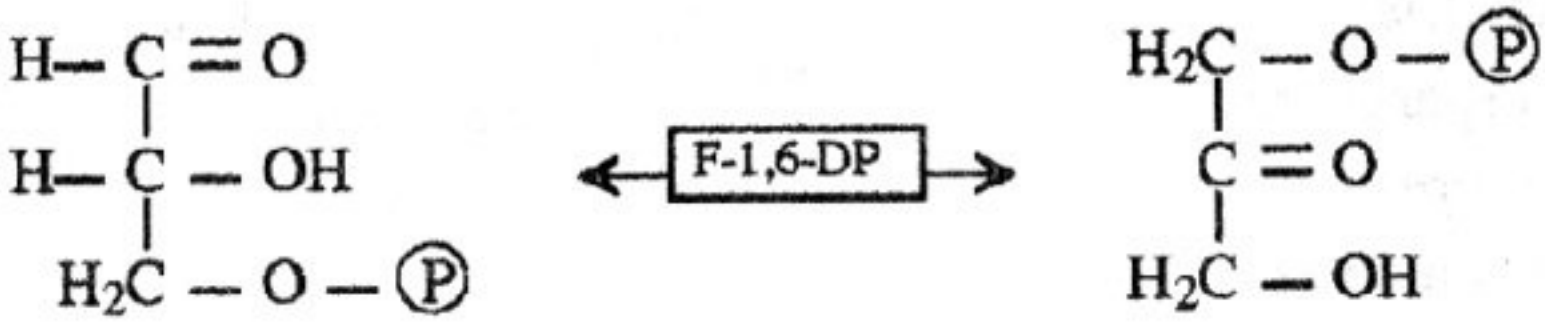
Determinarea **activității fosfatazei acide** se utilizează în special pentru detectarea carcinomului de prostată. Fracțiunea prostatică a fosfatazelor acide este inhibată de tartrat ceea ce permite o determinare diferențiată a acestei fracțiuni.

### *VI.3.4. LIAZE*

Aceste sisteme enzimatice catalizează reacțiile de desfacere a diferitelor legături dintre atomi fără intervenția apei.

### *VI.3.4.1. ALDOLAZA*

Aldolaza scindează esterul fructozo-1-6 bisfosfat în aldehida 3-P-glicerică și dihidroxiacetonfosfat.




**Determinarea activității aldolazei**

**Principiul metodei.** Triozofosfații rezultați în urma acțiunii aldolazei se combină cu 2,4-dinitrofenilhidrazina, în mediu alcalin, formând hidrazone de culoare roșie, a căror intensitate de culoare este direct proporțională cu cantitatea de trioze și deci cu cantitatea enzimei.

**Reactivi necesari:**

1. **Soluție tampon de colidină (trimetilpiridină).** Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 1,3 ml colidină, se adaugă 20-25 ml apă distilată și cu HCl se aduce pH-ul soluției la 7,5. Colidina poate fi înlocuită cu piridină pură dar în acest caz se ia 1 ml piridină la 100 ml apă distilată, iar pH-ul se ajustează la 7,4 cu NaOH 0,75 N.

2. **Soluție sulfat de hidrazină 0,56 N.** La 7,28 g sulfat de hidrazină se adaugă 75 ml NaOH 0,75 N. După ce se aduce pH-ul soluției la 7,4 se completează cu apă bidistilată până la 100 ml.

3. **Soluție acid monoiodacetic M/500.** Se dizolvă 0,0372 g acid monoiodacetic în 50 ml apă distilată. Se aduce pH-ul la 7,4 cu NaOH și se completează cu apă distilată până la semn în balon cotat de 100 ml.

4. **Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină (2,4-DNPH)** 0,1%. Se dizolvă 0,1 g 2,4-DNPH în HCl 2 N, în balon cotat de 100 ml.

5. **Soluție HCl 2 N.**

6. **Soluție HCl 1 N.**

7. **Soluție sulfat de Na 1 N.**

8. **Soluție fructozo-1,6-difosfat (sare de sodiu) 0,02 M.** Sarea de sodiu se obține din sarea de bariu a fructozo-1,6-difosfatului în felul următor: într-o eprubetă de centrifugă se introduc 108 mg din sarea de bariu care se dizolvă în 2 ml HCl 1 N, apoi se adaugă 1,04 ml soluție sulfat de sodiu 1 M. Se lasă amestecul 10 minute în repaus. Conținutul se centrifughează. Reacția este completă când nu se mai formează nici un precipitat prin adăugarea uneia sau mai multor picături de $Na_2SO_4$. Centrifugarea se efectuează la 3000-4000 rot/min. Supernatantul este trecut în balon cotat de 10 ml și se verifică pH-ul care trebuie să fie 7,4.

Pentru a putea obține acest pH, soluția se tratează cu NaOH 0,75 N adăugat cu picătura, verificând după fiecare picătură pH-ul. Când am obținut pH-ul dorit completăm cu apă distilată până la semn. Soluția poate fi folosită câteva săptămâni dacă se păstrează rece (+4ºC).

9. **Acid tricloracetic 10%.**

10. **Soluție NaOH 0,75 N.** Se dizolvă în balon cotat de 100 ml 3 g NaOH, după răcirea soluției se completează la semn cu apă distilată.

**Tehnica de lucru.** În eprubete perfect curate se introduc succesiv reactivii indicați în tabelul de mai jos:

| Reactivi | Eprubeta | |
|---|---|---|
| | 1 - probă | 2 - martor |
| Tampon colidină | 0,50 | 0,50 |
| Sulfat de hidrazină | 0,12 | 0,12 |
| Acid monoiodacetic | 0,12 | 0,12 |
| Fructozo-1,6-difosfat | 0,12 | 0,12 |
| Apă distilată | 0,14 | 0,14 |
| Ser nehemolizat | 0,50 | - |

| | | |
|---|---|---|
| După agitare se introduc în termostat la 37ºC pentru 60 minute | | |
| Acid tricloracetic<br>Ser nehemolizat | 1,50<br>- | 1,50<br>0,50 |
| Se centrifughează la 4000 rot/min sau se filtrează prin filtru cantitativ | | |
| Supernatant (filtrat)<br>NaOH 0,75 N | 1,0<br>1,0 | 1,0<br>1,0 |
| Se lasă în repaus 10 minute la temperatura camerei | | |
| 2,4-DNPH | 1 | 1 |
| Se introduc în termostat pentru 10 minute la temperatura 38ºC | | |
| NaOH 0,75 N | 7 | 7 |

După 5 minute se măsoară intensitatea coloraţiei la $\lambda = 530$ nm faţă de martor. După 15 minute intensitatea coloraţiei scade.

**Calculul rezultatelor.** Activitatea enzimei se exprimă în unităţi enzimatice şi pentru aceasta extincţia se multiplică cu 22,5:

$$mU/ml = 22,5 \times E$$

**Valori normale:** 0,5-3,1 mU/ml (25ºC)

Tabelul VI.11. **VARIAŢII PATOLOGICE ALE ALDOLAZEI SERICE**

| Valori scăzute | Valori crescute |
|---|---|
| • miotonii<br>• miastenie<br>• sechele de poliomielită | ▪ distrofie musculară progresivă<br>▪ infarct miocardic recent<br>▪ boli hepatice cu citoliză<br>▪ hepatită epidemică |

# VII. BAZELE BIOCHIMICE ALE EXPLORĂRILOR FUNCȚIONALE

## VII.1. EXPLORAREA FUNCȚIILOR HEPATICE

### *VII.1.1. FICATUL. GENERALITĂȚI. ROLURI BIOLOGICE*

Ficatul, unul din cele mai mari organe atât ca dimensiuni, cât și ca greutate (1450-1650 g), este denumit plastic, laboratorul central al organismului.

Ficatul este un organ cu poziție importantă și roluri metabolice multiple, complexe și diversificate.

Poziția sa anatomică și funcțională are două caracteristici și anume:

- reprezintă stația intermediară între vena portă și circulația generală;
- alcătuiește un sistem în strânsă interdependență cu plasma.

Toate substanțele resorbite din intestin, pe cale circulatorie, trebuie să treacă prin ficat care **primește, selecționează, anihilează** și **redistribuie** tuturor celorlalte organe și țesuturi substanțele necesare absorbite din intestin după digestie.

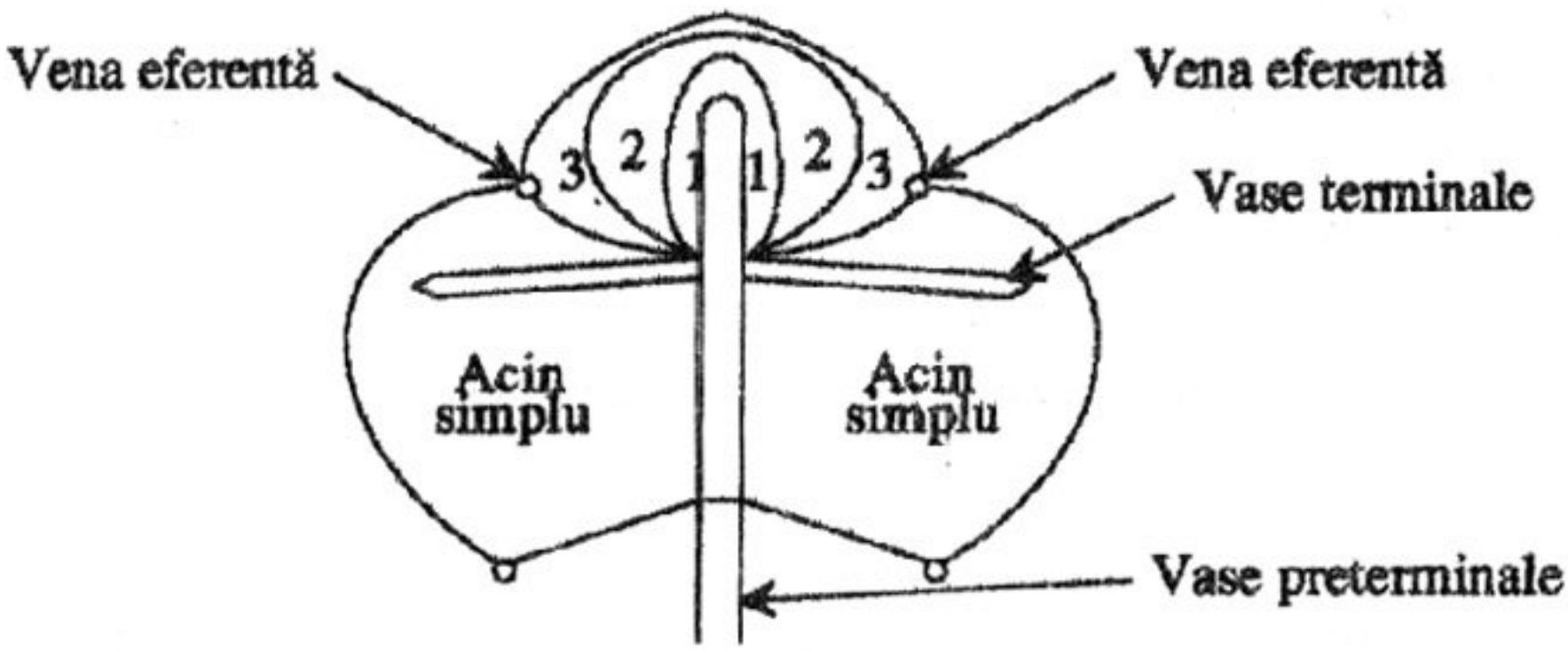



Fig.VII.1. **Structura acinului hepatic**

Ficatul intervine în reglarea echilibrului dintre cele două regimuri de concentrație, cel **oscilant** al venei porte și cel **constant** din circulația generală.

Unitatea morfo-funcțională, după Rappaport, este reprezentată de acinul hepatic care reprezintă o masă mică de parenchim hepatic asamblată în jurul unei axe centrale formată din arteriola hepatică, venula hepatică și canaliculul biliar.

Arteriolele hepatice au un rol organizator, în interiorul acinului hepatic ele generează un gradient al presiunii oxigenului care deservește zona centrală.

Acest gradient al presiunii oxigenului conduce la împărțirea acinului hepatic în 3 zone microcirculatorii, ce corespund unei zonări metabolice (vezi figura VII.1.).

Zona 1, periportală, are presiunea cea mai ridicată a oxigenului, zona a 2-a este intermediară iar zona a 3-a are presiunea oxigenului cea mai scăzută.

Zona 1, periportală, formată din hepatocite dispuse în imediata vecinătate a ramurilor vasculare axiale terminale primește sânge proaspăt bogat în oxigen și substanțe nutritive.

Ea reprezintă centrul cel mai activ și mai rezistent al acinului, cu cel mai mare potențial regenerativ.

Hepatocitele din zona I sunt bogate în mitocondrii mari, alungite și dispun de echipamentul enzimatic necesar reacțiilor din ciclul Krebs și glicoliză.

Concentrația mare de UDPG, UDPGT și fosforilază demonstrează că în aceste celule are loc sinteza glicogenului și glicogenoliza.

De asemenea, zona 1 este considerată sediul principal al metabolismului proteic și al sintezei de albumină.

Zona 2 reprezintă o arie de tranziție, care se orientează funcțional către regimul zonelor 1 sau 3, în funcție de creșterea sau descreșterea fluxului arteriolar.

Zona 3 perivasculară este aria în care se depozitează glicogenul, triacilglicerolii și pigmenții.

În această zonă activează oxidoreductazele **NAD⁺** și **NADP⁺** dependente precum și enzimele implicate în metabolizarea medicamentelor și substanțelor toxice.

Celulele hepatice din această zonă sunt mai vulnerabile la agresiuni de tipul anoxiei, ischemiei sau carenței nutritive.

Din punct de vedere histologic, ficatul este format din două tipuri principale de celule, distincte ca structuri și caracteristici metabolice și anume:

A - **hepatocitele** - cu funcții metabolice

B - **celule sinusoidale** - diferențiate citologic în 4 tipuri:

► celule endoteliale; ► celule Kupffer; ► celule cu grăsimi; ► celule cu găuri ("pit cell"), având roluri de apărare, detoxifiere, de filtrare a particulelor, endocitoză etc.

Ficatul participă într-o serie de procese metabolice importante:

I. - **Participarea ficatului în metabolismul glucidic**

• este organul atât al producției cât și al consumului de glucoză;

• participă în glicoliză cât și în calea pentozo-fosfaților;

• participă în glicogenoliză și gluconeogeneză;

• intervine în reglarea glicemiei;

• participă în gluconeogeneză și depozitează glicogenul.

II. - **Participarea ficatului în metabolismul lipidic**

▪ participă în sinteza, oxidarea și esterificarea acizilor grași;

▪ realizează sinteza și secreția lipoproteinelor;

▪ sintetizează, esterifică și degradează colesterolul;

▪ formarea corpilor cetonici.

III. - **Participarea ficatului în metabolismul proteic**

◆ ficatul reprezintă sediul major al sintezei unor proteine: albumina, fibrinogenul, anumite globuline, α-1-glicoproteinele, α-2-haptoglobina, transferina, ceruloplasmina etc.;

◆ dezaminarea aminoacizilor;

◆ ciclul ureogenetic;

◆ elaborează o parte din aminoacizii necesari sintezei proteice.

IV. - **Funcția biliară**

Constă în formarea de bilă, produsul de excreție al ficatului care deține un rol vital în mecanismul absorbției intestinale. Sărurile biliare se formează pe seama acizilor biliari, sintetizați de către ficat.

V. - **Rolul ficatului în sinteza factorilor de coagulare.**

Ficatul deține un rol major în sinteza fibrinogenului, a protrombinei, a proaccelerinei și a altor factori implicați în procesul coagulării.

VI. - **Rolul ficatului în metabolizarea alcoolului și metabolizarea hormonilor steroizi.**

Aceste procese reprezintă un caz particular al procesului de detoxifiere.

VIII. - **Funcția antitoxică a ficatului.**

Transformările metabolice ale diverselor substanțe exo sau endogene pot să ducă la formarea unor metaboliți toxici pentru organism, a căror detoxifiere revine în cea mai mare măsură ficatului. Substanțele toxice endogene formate la nivelul colonului prin acțiunea florei microbiene asupra substanțelor proteice (**histamină, fenol, indol, scatol**) sunt primele care ajung pe calea circulației portale. Aici ele sunt detoxifiate prin intermediul proceselor de conjugare, oxidare, hidroliză și reducere.

Procesele de conjugare se efectuează cu ajutorul următoarelor substanțe:

- acidul glucuronic;
- glicina;
- cisteina;
- glutationul.

Enzimele care participă la aceste procese sunt localizate în microzomi. Toate substanțele toxice și medicamentoase sunt în general convertite în substanțe cu solubilitate hidrică crescută și polaritate mare, favorizându-le astfel excreția urinară.

Datorită complexelor implicații metabolice, și deoarece ficatul poate funcționa în aparență normal chiar în condițiile în care **80%** din celulele sale sunt afectate, se înțelege de ce există un mare număr de analize și de ce este imposibil de interpretat cu o singură analiză gradul și tipul de leziune hepatică.

Deoarece cele **20%** din celulele valide pot suplini cele **80%** din celulele afectate chiar în cazul unor afecțiuni cronice grave, majoritatea testelor hepatice vor fi normale sau doar ușor modificate.

Aceasta deoarece organismul caută o contrabalansare, o compensare a defecțiunii metabolice ce va duce în cazul bolilor cronice la o aparentă revenire spre normal a rezultatelor analizelor.

### *VII.1.2. METODOLOGIA DE STUDIU A FUNCȚIILOR HEPATICE*

Explorarea biochimică hepatică este de maximă importanță medicală deoarece se estimează că mai mult de 5% din populație suferă de una din diversele boli hepatice, acute sau cronice.

Numeroasele determinări ce pot fi utilizate în explorarea funcțiilor hepatice sunt împărțite în patru grupe distincte după tipul de informații pe care îl aduce:

- **analiza de "screening"** (a cerne) pentru a depista în mod precoce o stare incipientă de afectare hepatică;
- **analize de precizare de diagnostic** prin intermediul cărora se confirmă disfuncția hepatică;
- **analize de specificare** a tipului, gradului și localizării tulburării hepatice;
- **analize cu rol de prognostic** al sensului în care evoluează afectarea hepatică: prognostic: bun/rău, acut/cronic.

În fiecare din aceste patru grupe sunt incluse numeroase analize biochimice care contribuie în mod diferit cu o utilitate mai mare sau mai mică în funcție de modul în care răspund la următoarele deziderate:

- **sensibilitate** în precizarea unei anumite afecțiuni hepatice;
- **specificitate** față de afecțiunea respectivă;
- **selectivitate** în diferențierea afecțiunii.

Având în vedere bazele fizio-patologice ale afecțiunilor hepato-biliare, testele biochimice vor fi grupate în sindroame și interpretate în contextul datelor clinice.

Există 4 mari sindroame hepato-biliare și anume:

- sindromul hepatopriv;
- sindromul de inflamație mezenchimală;
- sindromul bilio-excretor;
- sindromul de citoliză hepatică.

## I. SINDROMUL HEPATOPRIV

Testele biochimice utilizate pentru evaluarea sindromului hepatopriv investighează capacitatea ficatului de sinteză a albuminei, a fibrinogenului, a factorilor de coagulare din complexul protrombinic, precum și participarea sa la esterificarea colesterolului, la efectuarea unor procese de conjugare și la sinteza unor enzime.

**Proteinele plasmatice** produse de hepatocite sunt sintetizate de ribozomii legați pe reticulul endoplasmatic rugos, de unde ajung în plasmă.

Scăderea concentrației proteinelor plasmatice reflectă de obicei scăderea sintezelor hepatice sau pierderile intestinale și/sau renale.

Hepatocitele sintetizează albumină, fibrinogen, haptoglobină, $\alpha_1$-antitripsină, ceruloplasmină, transferină și protrombină.

Anumite proteine sintetizate de hepatocite cresc ca răspuns la leziunile tisulare, cum ar fi inflamația (reacție de fază acută) și anume: fibrinogenul, haptoglobina, $\alpha_1$-antitripsina, fracțiunea $C_3$ a complementului și ceruloplasmina.

Mecanismul este complex, un rol important revenind citokinelor (interleukinele Il 1 și Il 6 și factorul de necroză tumorală α-TNF).

Citokinele stimulează producția proteinelor de fază acută dar inhibă sinteza albuminei, transferinei și a altor proteine.

**Albumina,** componenta majoră a proteinelor plasmatice, reprezentând 55-60% din totalul lor este sintetizată exclusiv în ficat.

Scăderea concentrației albuminei poate avea cauze diverse (de nutriție, cancere digestive, sindrom de malabsorbție) dar cauza esențială rămâne insuficiența hepatocitară.

Gradul hipoalbulinemiei are valoare prognostică constituind un bun criteriu de evaluare a severității leziunilor hepatocitare.

**Colinesterazele** sunt reprezentate de pseudocolinesteraza ChE nespecifică și acetilcolinesterazele specifice.

Pseudocolinesteraza nespecifică este sintetizată de ficat și eliberată în ser. Valorile normale în ser sunt cuprinse între 3000-8000 mUI/ml și scad în insuficiența hepatocelulară.

Nivelul seric al pseudocoliesterazei se corelează cu cel al albuminei și protrombinei reprezentând cei mai fideli markeri ai sintezelor proteice.

**Factorii coagulării.** Hepatocitele sintetizează protrombina proaccelerina, proconvertina, factorul X Stuart și factorul XI (PTA).

Timpul de protrombină (testul Quick) explorează în mod global complexul protrombinic. Scăderea indicelui de protrombină sub 40% semnifică insuficiență hepato-celulară gravă, iar în ciroza hepatică, prognostic sever.

**Fibrinogenul plasmatic** are semnificații diferite în bolile hepatice.

În hepatitele acute este crescut iar în cirozele avansate este scăzut sub 200 mg%.

**Colesterolul,** în special colesterolul esterificat, este un marker fidel al funcției de sinteză și esterificare.

Ficatul este sursa majoră de colesterol endogen. Pentru sinteza acizilor biliari ficatul folosește 80% din colesterolul hepatocitar iar restul trece în bilă sub formă de colesterol liber.

Colesterolul total scade în cirozele decompensate și crește în ciroza biliară primitivă și icterul mecanic.

Colesterolul esterificat scade în insuficiența hepatică și are prognostic sever.

**Acizii biliari** sunt componenți esențiali ai bilei ce rezultă din catabolismul colesterolului.

Concentrația acizilor biliari în ser este de 2,26 μg/ml (6 mMol/l) reprezentând 1/1000 din concentrația lor în bilă.

În insuficiența hepatică se produce o scădere a acizilor biliari în ser și bilă.

Acizii biliari cresc în ser în icterele mecanice.

**Testul galactozuriei provocate** explorează funcția glicogenică a ficatului. Sinteza glicogenului și glicogenoliza au mecanisme de reglări determinate multifactorial, ceea ce explică specificitatea redusă a testelor de investigație a metabolismului glucidic pentru ficat.

Metabolizarea galactozei are loc în exclusivitate în ficat și musculatura netedă a intestinului subțire.

Testul poate fi efectuat prin administrarea orală a galactozei dar se preferă calea intravenoasă utilizând 350 mg/kg corp de galactoză dozându-se galactozemia în sângele capilar din 10 în 10 minute.

Valoarea diagnostică a testului este maximă în hepatitele acute.

## II. SINDROMUL DE INFLAMAȚIE MEZENCHIMALĂ

Sindromul de inflamație mezenchimală sau de activare imunologică explorează mecanismele imune implicate în bolile hepatice.

Gamaglobulinele reprezintă 21% din proteinele totale și sunt sintetizate de celulele B ale sistemului limfoid.

**Creșterea gamaglobulinelor** constituie un marker fidel al activității mezenchimului hepatic, fiind direct proporțională cu gradul de inflamație mezenchimală.

Creșterea imunoglobulinelor evidențiată prin imunoelectroforeză constituie un argument în favoarea mecanismelor imune implicate în bolile hepatice.

În hepatita cronică autoimună cresc predominant IgG și IgM, în ciroza biliară cresc IgM iar în ciroza etanolică IgG și IgA.

**Anticorpii antialbumină** (AAA) reprezintă o categorie de anticorpi din clasa IgM a căror pozitivare este un bun indicator al gradului de alterare a hepatocitelor.

În bolile cronice hepatice, AAA prezintă o creștere progresivă de la hepatitele cronice la cirozele hepatice.

## III. SINDROMUL EXCRETO-BILIAR

Prin acest sindrom se investighează funcția biliară a ficatului, a cărei explorare se face prin cercetarea componenților biliari și a factorilor care se elimină prin bilă în sânge, urină sau fecale.

**Bilirubinemia** este un test de investigație curentă a oricărei afecțiuni hepatice.

Hiperbilirubinemia poate să rezulte din:

- producerea în exces a pigmenților biliari;
- insuficiența captării, conjugării sau excreției;
- refluxul bilirubinei conjugate sau neconjugate din hepatocitele sau canaliculii biliari lezați.

Dozarea bilirubinei directe și indirecte este obligatorie pentru diagnosticul icterelor.

**Urobilinogenul** rezultă prin reducerea bacteriană a bilirubinei în intestin, fiind parțial resorbit în circulația portală (10-15%) și degradat în ficat, restul (40-250 mg/24 h) este eliminat prin fecale (stereobilinogen) și urină ca urobilinogen (0,2-2,2 mg/24 h).

La icterici, absența urobilinogenului în urină semnifică obstrucția biliară completă, adesea de etiologie malignă.

Tabelul VII.1. **UROBILINOGENUL ȘI BILIRUBINA URINARĂ ÎN ICTERE**

| Tipul de icter | Urobilinogen urinar | Bilirubina urinară |
|---|---|---|
| Icter hemolitic | crescut | absentă |
| Icter hepatocelular | crescut | prezentă |
| Icter mecanic | scăzut | prezentă |

Modificările urobilinogenului și bilirubinei urinare orientează încadrarea tipurilor de icter (tabelul VII.1.).

Enzimele care se elimină prin bilă, fosfataza alcalină, leucinaminopeptidazele, 5-nucleotidaza și glutamil transpeptidaza sunt crescute în sânge în icterele de colestază.

**Porfobilinogenul și coproporfirinele**

Ficatul participă atât la sinteza cât și la degradarea porfirinelor. În porfiriile hepatice primare, în special porfiria cutanată tardivă se constată eliminarea urinară de uroporfirină și coproporfirină I.

Coproporfirinurii secundare cu izomeri de tip I apar în hepatitele și cirozele de etiologie virală, iar în ciroza etilică cu izomeri de tip III.

## IV. SINDROMUL DE CITOLIZĂ HEPATICĂ

Sindromul de hepatocitoliză definește ansamblul de perturbări histologice și biochimice hepatice și umorale, secundare unor agresiuni și variabile, care pot să evolueze progresiv și al căror stadiu final este necroza hepatocitară.

Sindromul umoral al citolizei hepatice se datorește trecerii în plasmă a constituienților enzimatici și minerali ai hepatocitelor lezate.

### Modificări enzimatice

Dintre cele 3 grupe de enzime pe care le elaborează hepatocitele (secretoare, excretoare, indicatoare), numai enzimele indicatoare au semnificație pentru hepatocitoliză.

### Transaminazele

Cele mai cunoscute sunt aspartataminotransferaza (ASAT) sau transaminaza glutamic-oxalacetică (GOT) și alaninaminotransferaza (ALAT) sau transaminaza glutamic-piruvică (GPT).

Transaminaza glutamic-oxalacetică (GOT) este o enzimă cu localizare mixtă (mitocondrială și citosolică) prezentă în cord, ficat, mușchi scheletici și rinichi, care crește în ser în leziunile acute ale acestor țesuturi, cu distrugeri tisulare.

Transaminaza glutamic-piruvică (GPT) este o enzimă citosolică prezentă mai ales în ficat și mai puțin în miocard și mușchi scheletici.

Există o corelație strânsă între necroza hepatică și creșterea transaminazelor serice întâlnită în bolile hepatice acute și fazele evolutive ale bolilor hepatice cronice.

Cele mai mari valori ale transaminazelor serice se întâlnesc înhepatitele acute de etiologie infecțioasă sau toxică.

ASAT (GOT) crește concordant cu ALAT (GPT) unii autori considerând ASAT indicatorul cel mai sensibil al leziunilor hepatice acute minime.

Raportul de Rittis $\frac{ASAT}{ALAT}$ = 1,33 la indivizii normali iar valoarea lui în jur de 0,65 este patognomonică pentru hepatita acută de etiologie virală.

Creșterea transaminazelor în hepatitele cronice și cirozele hepatice este moderată și variabilă, coincizând cu episoadele evolutive.

În cancerul hepatic primitiv nu se produc modificări semnificative, iar în metastazele tumorale se observă creșteri mici.

Cauzele extrahepatice ale creșterii transaminazelor sunt: pancreatite, infarctul miocardic, afecțiunile biliare sau administrarea unor medicamente (oxacilină, negram, anticoagulante).

**Lactatdehidrogenaza (LDH)** este o enzimă citoplasmatică, ea prezintă 5 izoenzime formate prin combinarea celor 2 tipuri de subunități polipeptidice 2H (heart = inimă) și 2M (muscle = mușchi).

Izoenzimele $LDH_4$ și $LDH_5$ sunt prezente în țesuturile cu glicoliza anaerobă intensă (mușchi, ficat). Activitatea acestor izoenzime nu se modifică semnificativ în afecțiunile hepatice acute, dozarea lor poate constitui o indicație cu caracter prognostic în momentul în care activitatea lor serică rămâne crescută în timp.

**Glutamatdehidrogenaza (GLDH)** este o enzimă mitocondrială și nu apare în ser în condiții normale.

Creșterea activității GLDH indică o leziune gravă la nivel mitocondrial, întâlnită în necroza hepatică, distrofia acută și coma hepatică severă.

**Ornitin-carbamiltransfera (OCT)** este o enzimă hepatocitară cu mare specificitate ce îi conferă o valoare deosebită pentru detectarea leziunilor hepatice și citolizei minore.

Sorbitoldehidrogenaza, izocitratdehidrogenaza și malatdehidrogenaza sunt alte enzime a căror activitate este determinată în afecțiunile hepatice.

## V. MODIFICĂRI MINERALE

**Sideremia.** Hepatocitele sunt implicate în metabolismul fierului prin procesul de biosinteză a transferinei - proteina transportoare - și prin procesele de depozitare sub formă de feritină sau hemosiderină.

Fierul se eliberează din hepatocite prin citoliză în hepatitele acute virale și poate fi un test util pentru aprecierea evoluției. Sideremia crește și în fazele evolutive ale hepatitelor cronice și cirozelor hepatice.

Cupremia. Ficatul este principalul organ de depozitare a cuprului iar eliminarea se face predominant prin bilă, în intestin.

Valori normale 70-140 μg/100 ml la bărbați
80-150 μg/100 ml la femei

Valori curente ale cupremiei au fost înregistrate în icterele mecanice.

În boala Wilson cupremia și ceruloplasminemia sunt foarte scăzute.

## VII.2. DIAGNOSTICUL ENZIMATIC ÎN INFARCTUL MIOCARDIC

Mușchiul cardiac este sediul a numeroase enzime ce catalizează variate reacții chimice dintre care de o mare importanță sunt cele ce participă în procesele energetice.

Inima este un organ cu dimensiune relativ mică, în care procesele metabolice decurg cu intensități constant ridicate, fără particularități deosebite, dominând însă procesele catabolice și cu precădere acelea de producere a energiei chimice necesare transformării în energie mecanică pentru realizarea efortului continuu al acestui organ.

Enzimele mușchiului cardiac pot difuza în ser în urma unor diverse tulburări, dar mai ales după infarct miocardic.

Cauza principală a infarctului este o ocluzie coronariană consecutivă unei tromboze la nivelul unui vas sanguin aterosclerotic.

În consecință, se va produce o hipoxie acută, o lipsă de oxigen la nivel tisular, care va conduce la o necroză, iar prin modificarea permeabilității celulare, o serie de enzime vor difuza în ser.

Cauzele prezenței unei activități crescute a enzimelor miocardice sunt următoarele:

- boli cardiace ischemice: angina pectorală, infarctul miocardic;
- miocardite;
- pericardite;
- cateterismul cardiac;
- transplantul cardiac.

Analizele biochimice cu relevanță pentru diagnostic constau în determinarea activității unor enzime serice, izoenzime și recent determinarea anumitor proteine structurale ale mușchiului cardiac.

Aceste determinări includ:

- creatin-kinaza;
- L-lactatdehidrogenaza;
- aspartataminotransferaza;
- mioglobina;

• complexul troponinelor.

Activitatea tuturor acestor enzime crește în ser din primele ore ale infarctului și rămâne crescută mai multe zile conform tabelului VII.2. În afară de aceste enzime o mare valoare diagnostică o are dozarea **mioglobinei** serice și a complexului troponinelor.

Tabelul VII.2. **ACTIVITĂȚILE UNOR ENZIME SERICE DUPĂ INFARCTUL MIOCARDIC**

| **Enzime** | **Ore de la infarct** | **Maxim de activitate (ore)** | **Revenire la valorile normale (ore)** | **Creșteri față de normal (%)** |
|---|---|---|---|---|
| Creatinkinaza | 4-8 | 16-36 | 3-6 | 5-50 |
| ASAT (GOT) | 4-8 | 24-48 | 4-7 | 5-25 |
| ALAT (GPT) | 15-24 | 48-72 | 3-6 | 5-10 |
| LDH | 8-10 | 48-60 | 8-15 | 2-10 |
| LDH-H | 8-10 | 21-92 | 10-12 | 20-60 |

Creșterea în ser a activității enzimelor de mai sus constatată în mai mult de 95% din cazuri de infarct miocardic reprezintă deci un deosebit de util indiciu în precizarea diagnosticului. Modalitatea cea mai curentă de cercetare a stării funcționale a inimii o constituie electrocardiografia (EKG), dar această metodă are o serie de limitări, fapt care necesită pentru punerea unui diagnostic exact și efectuarea unei determinări de activități enzimatice. De exemplu, numai 50% din pacienții care au avut mai multe infarcte mai prezintă un EKG ce permite diagnosticul exact al unui nou infarct și numai 80% după un infarct inițial.

În concluzie, cele două modalități de investigare EKG și determinarea activității enzimatice a serului trebuie efectuate împreună, rezultatele obținute nu numai că nu se contrazic dar fiecare metodă dând informații suplimentare, complementare, pot defini în mod clar afecțiunea, precum și gravitatea și prognoza ei.

Analiza enzimatică a afecțiunilor cardiace se mai dovedește deosebit de utilă și în cazurile insidioase, în acelea în care EKG-ul nu este modificat semnificativ sau când se bănuiesc deformații

preexistente. Ori, aceste cazuri nu sunt rare, putând reprezenta în medie 10-20% din cazurile incerte. Reamintim că după un prim infarct traseul EKG se menține modificat și, în consecință, nu se poate diagnostica exact un reinfarct, caz însă precis și sensibil evidențiat printr-o analiză enzimatică adecvată. De asemenea, revenirea între valorile normale ale activităților enzimelor este o dovadă clară a unei refaceri a zonei tisulare cardiace necrozate și care este conformă cu starea clinică a bolnavului.

◆ Aspartataminotransferaza (**transaminaza glutamic-oxalacetică**) prezintă o activitate crescută în mai mult de 75% din cazurile de infarct miocardic. Deși GPT este o enzimă localizată mai ales în ficat, determinarea ei în infarctul miocardic este, în unele cazuri, utilă pentru a se putea aprecia dacă în același timp nu au loc și complicații hepatice. Este, prin urmare, necesar în unele cazuri să se precizeze raportul GOT/GPT care, în cazul infarctului miocardic, este totdeauna mai mare decât 1. Activitatea transaminazelor trebuie urmărită și în timp deoarece valorile constant crescute indică o evoluție defavorabilă bolii.

◆ **Lactat dehidrogenaza**, deși nu este o enzimă localizată specific în inimă, prin creșterea apreciabilă a activității ei serice este mult determinată în biochimia clinică pentru precizarea infarctului miocardic. Activitatea ei totală se menține la valori ridicate atât timp cât persistă zona de necroză cardiacă. Revenirea între limitele normale reprezintă un prim indiciu evident al unei evoluții favorabile sau, atunci când valorile rămân crescute, al unei desfășurări defavorabile a bolii.

Revenirea între limitele normale reprezintă un indiciu evident al unei evoluții favorabile.

Activitatea serică a LDH totală este la indivizii normali de: 200 - 380 (P - L) U/l sau 100 - 200 (L - P) U/l.

O altă dovadă a unui infarct miocardic o constituie creșterea izoenzimei $LDH_1$ (tip inimă) care, de asemenea, crește după primele ore de la infarct și nu revine între limitele normale decât odată cu refacerea țesutului lezat.

◆ **Creatinfosfokinaza**, enzimă ce catalizează reformarea ATP din creatinfosfat, este o enzimă localizată numai la mușchii scheletici, inimă și creier. Prin urmare, creșterea ei în ser nu poate fi datorată decât

unei tulburări într-unul din țesuturile citate. În cazul unui infarct activitatea ei serică crește înaintea oricărei manifestări clinice tipice sau a traseului EKG, reprezentând deci indicele cel mai precoce al acestei afecțiuni (figura VII.2.).

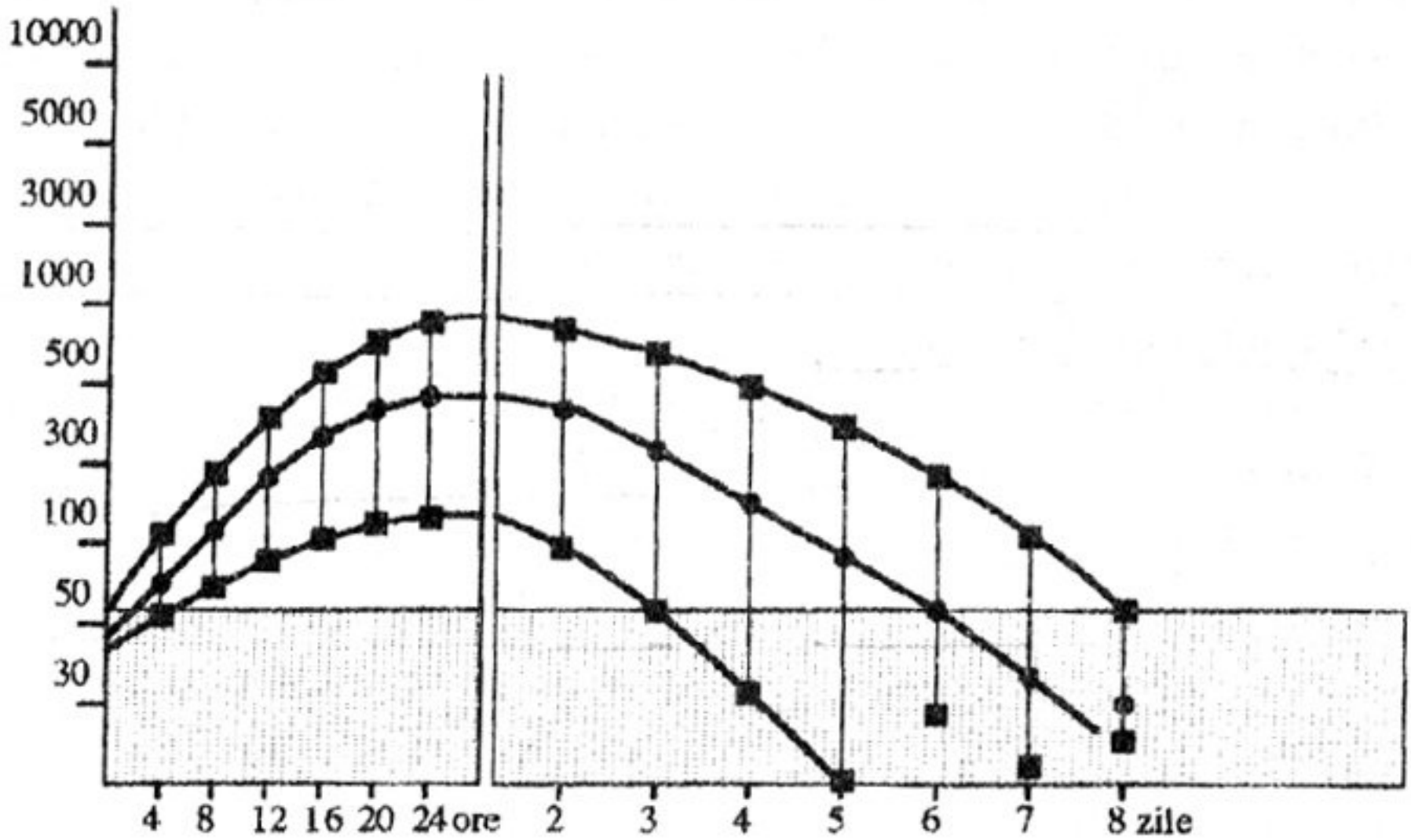



Fig.VII.2. **Variația creatin fosfokinazei în infarct miocardic**

Este o enzimă dimerică formată din 2 subunități: B (brain) și M (muscle).

Prezintă 3 izoenzime: CK-BB predominantă în creier, CK-MM predominantă în mușchii scheletici și mușchiul cardiac și CK-MB în mușchiul cardiac și mușchii scheletici.

Activitatea creatinkinazei, la indivizii sănătoși, depinde de vârstă, sex, rasă, greutate corporală și activitatea fizică.

Valorile normale de referință sunt:

- 26-140 U/l la femei;
- 38-174 U/l la bărbați.

Importanță deosebită pentru diagnosticul infarctului de miocard prezintă izoenzima CK-MB care se găsește localizată în mușchiul cardiac.

Valoarea normală a izoenzimei CK-MB este cuprinsă între 15-25 U/l.

Figura VII.3. prezintă modelul (pattern) separării electroforetice a izoenzimelor CK pentru un adult sănătos (A) și pentru un subiect cu infarct miocardic la 24 h de la debut (B).

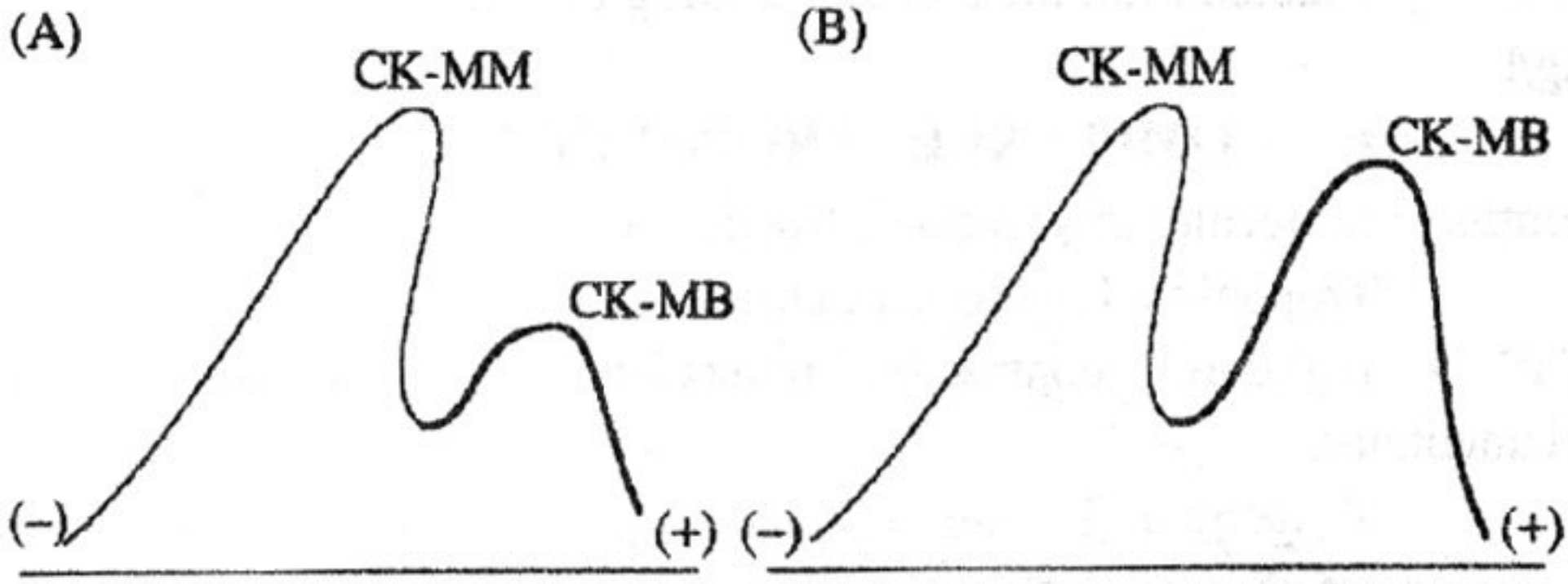



Fig.VII.3. **Modelul separării electroforetice a izoenzimelor CK**

De asemenea, valoarea ei constă și în faptul că, având un mare grad de organ-specificitate, se poate preciza cu exactitate diagnosticul de infarct, precizare necesară deoarece există o serie de tulburări cu manifestări asemănătoare infarctului. O altă dovadă a unui infarct o constituie creșterea izoenzimei lactat dehidrogenazei tip inimă care, de asemenea, crește după primele ore de la infarct și nu revine între limitele normale decât odată cu refacerea țesutului lezat (figura VII.4.).

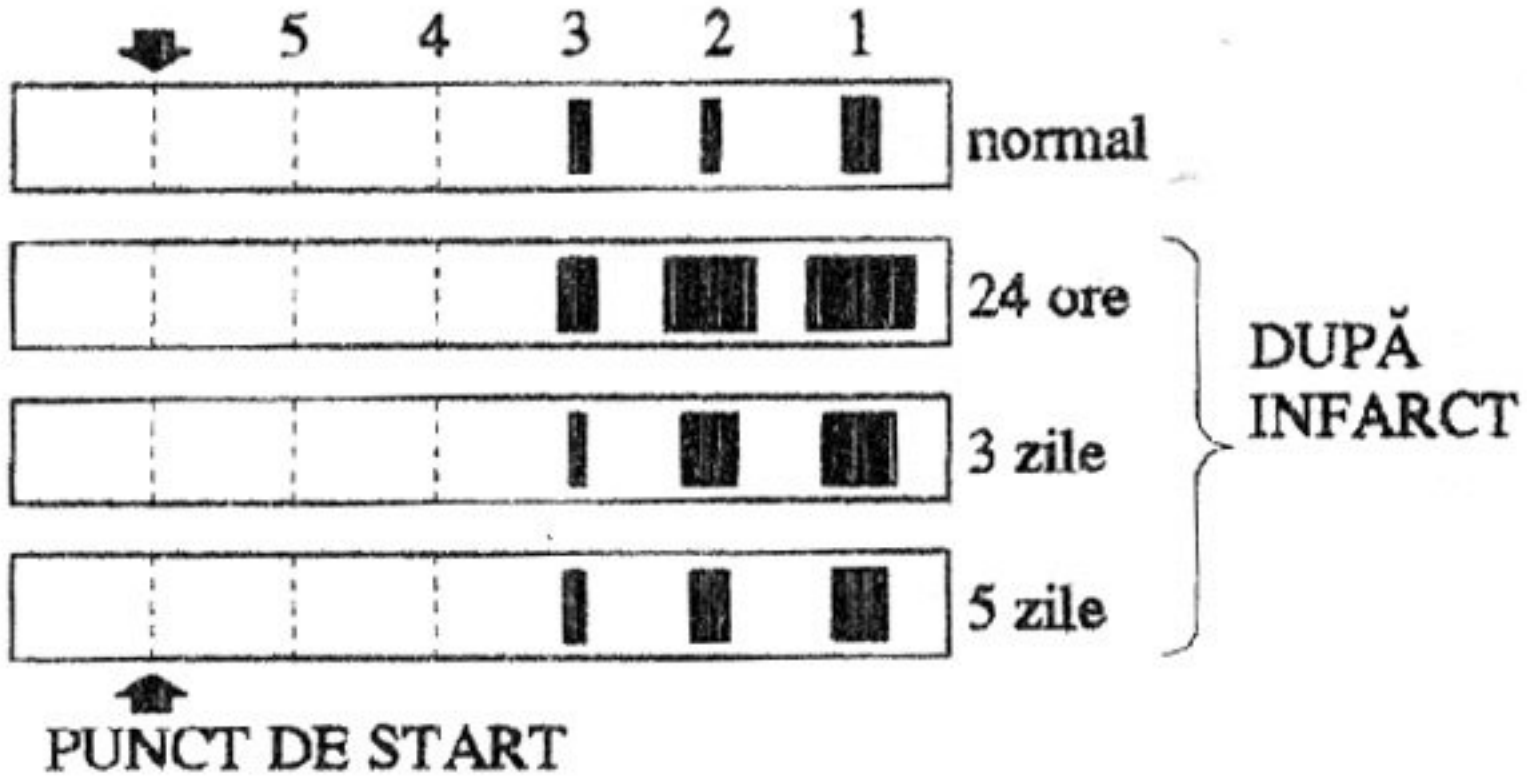



Fig.VII.4. **Imaginea electroforetică a izoenzimelor LDH în infarct miocardic**

► **MIOGLOBINA** - proteină heminică este prezentă în citoplasma tuturor celulelor musculare.

Dimensiunile mici și localizarea celulară permit eliberarea rapidă din celulele miocardice lezate fiind un marker pentru infarctul miocardic.

Valoarea normală în ser a mioglobinei este mai mică de 90 μg/l

► **COMPLEXUL TROPONINELOR.** Acest complex conține 3 molecule: tropoñina C, troponina I și troponina T.

Troponina C suferă modificări conformaționale prin legarea $Ca^{2+}$ - reglatorul contracției musculare, care inițiază mișcarea filamentelor.

Troponina I este o subunitate inhibitorie care previne contracția în absența $Ca^{2+}$ și troponinei C.

Troponina T leagă complexul troponinic la tropomiozină. Valoare normală (VN): 0,1 μg/l.

Troponina T este investigată mai mult.

Apare la 4-8 ore după debutul simptomelor, are 2 maxime, în ziua a 2-a și a 4-a și rămâne crescută până la 14 zile, model ilustrat în figura VII.5.

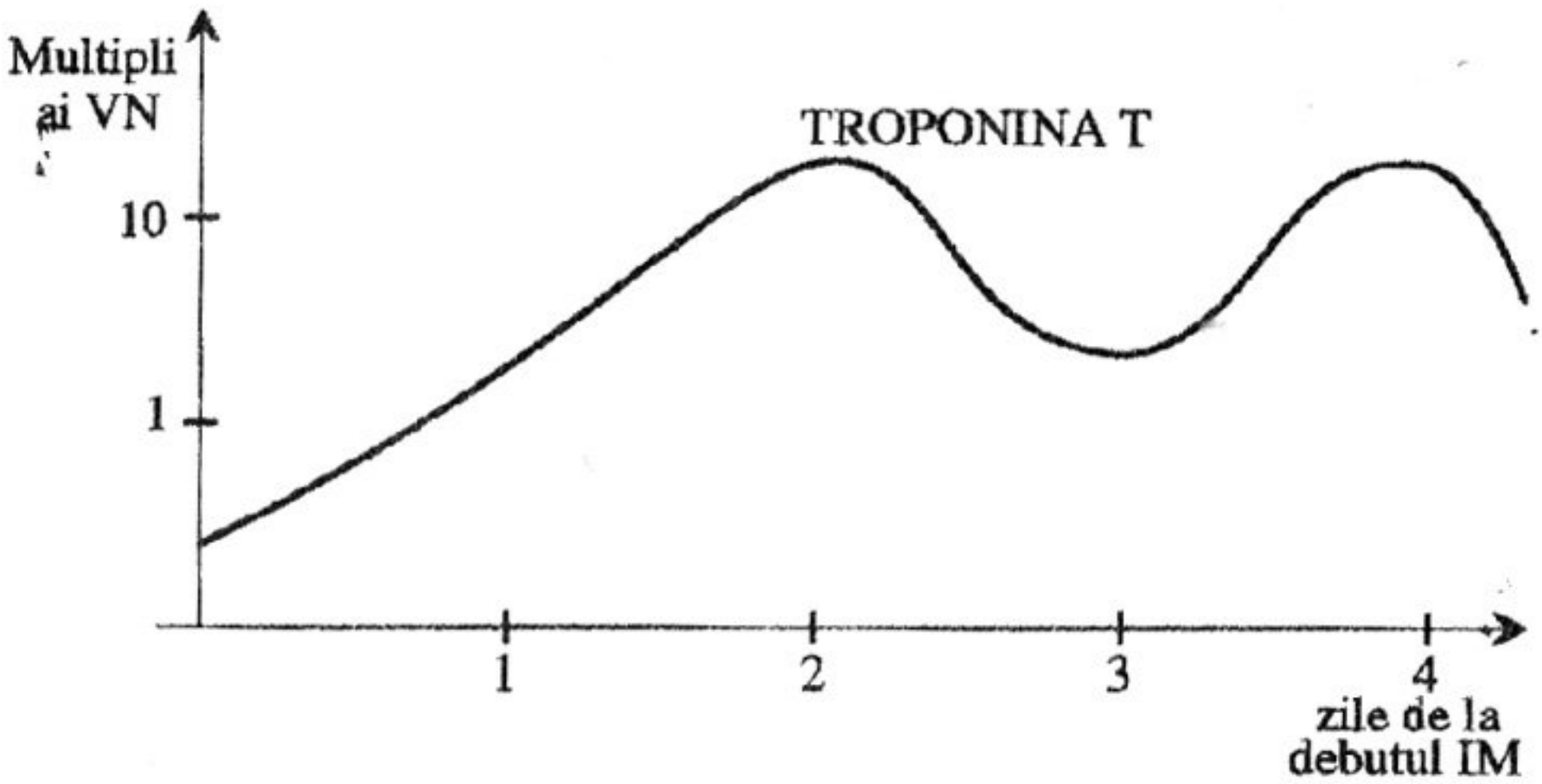



**Fig.VII.5. Creșterea concentrației troponinei T în infarctul miocardic**

În figura VII.6. prezentăm evoluția în timp a activității enzimelor cu rol de diagnostic în infarctul miocardic, în care s-a inclus

și variația cantitativă, relativă a mioglobinei. Această figură exemplifică cazurile tipice cu evoluție favorabilă.

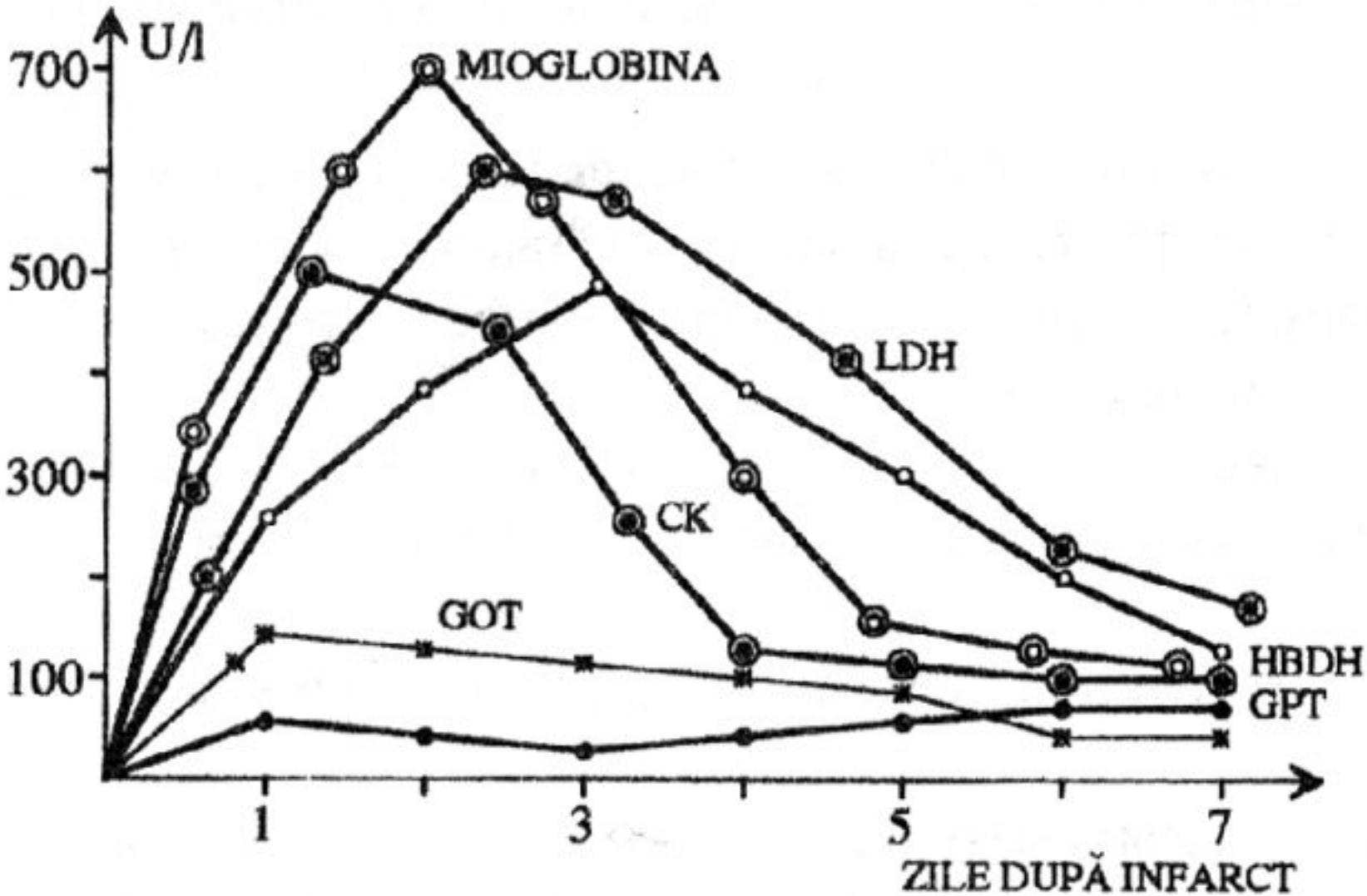



Fig.VII.6. **Evoluția în timp a activității enzimelor și mioglobinei în infarctul miocardic**

# VII.3. EXPLORAREA FUNCȚIONALĂ RENALĂ

## *VII.3.1. GENERALITĂȚI DESPRE FUNCȚIILE RINICHILOR*

Rinichii au marele rol de a curăța sângele de toate substanțele nefolositoare organismului ca de exemplu toți catabolitii celor trei metabolisme principale sau substanțele străine sau chiar toxice introduse accidental în organism.

Dar o altă participare a rinichilor este de a menține homeostazia organismului. Sintetizând, rinichii îndeplinesc următoarele funcții:

- reglează metabolismul apei și electroliților (**izohidrie, izoionie**);
- mențin echilibrul acido-bazic;
- elimină produșii de catabolism și substanțele toxice din organism (uree, creatinină, acid uric, bilirubină etc.).

Aceste funcții sunt realizate de rinichi prin următoarele procese fundamentale:

- circulația sanguină renală;
- filtrarea glomerulară;
- reabsorbția selectivă;
- secreția activă tubulară.

Activitatea rinichiului poate fi explorată prin trei direcții principale:

- Analiza fizico-chimică a urinei;
- Determinarea unor parametri sanguini în care participarea rinichilor este obligatorie;
- Explorarea principalelor mecanisme funcționale renale propriu-zise - glomerulare și tubulare.

**Circulația sanguină renală.** Rinichii reprezintă numai 0,4% din greutatea corporală, dar dispun de o irigație impresionant de mare fiind capabili să filtreze în medie pe zi 1500 l sânge, fluxul sanguin renal fiind de 900-1200 ml sânge/minut.

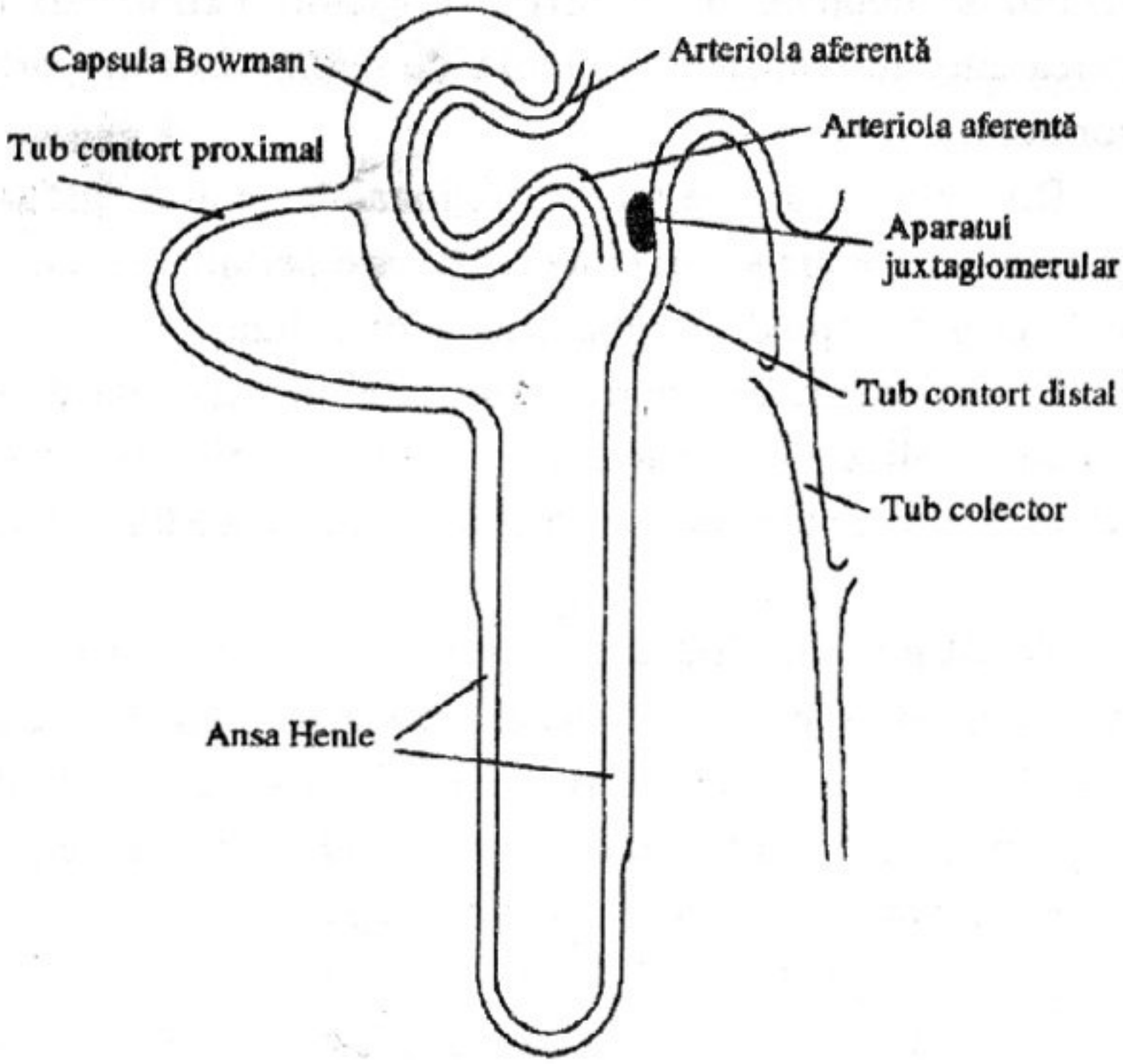



**Fig.VII.7. Nefronul**

Această cantitate de sânge este inegal distribuită: zona corticală primește 70-80% iar cea medulară restul. Datorită vascularizației diferențiate atât din punct de vedere topografic cât și funcțional, circulația sanguină renală se clasifică în **pre** și **postglomerulară.**

Unitatea morfo-funcțională în care se formează urina este nefronul (rinichiul conține aproximativ un milion de nefroni) a cărui reprezentare schematică anatomică și funcțională este ilustrată în figura VII.7.

### *VII.3.2. FILTRAREA GLOMERULARĂ*

Filtratul glomerular este rezultatul proceselor fizice petrecute la nivelul glomerulilor în urma cărora se obține urina primară care se deosebește de compoziția plasmei sanguine prin lipsa proteinelor și a lipidelor. Acest proces se datorează proprietăților morfofuncționale ale

glomerulului și depinde de o serie de factori extrarenali cât și de participarea unor mecanisme complexe de reglare în care participă mai mulți hormoni.

Din punct de vedere funcțional capilarul glomerular se prezintă ca o membrană semipermeabilă, care permite trecerea selectivă a moleculelor în funcție de greutatea lor moleculară.

Dinamica filtrării glomerulare este condiționată de mai mulți factori care realizează separarea proteinelor din plasmă și apoi propulsează prin membrana filtrantă semipermeabilă faza lichidă rezultată.

**Presiunea de filtrare** - presiunea eficace de filtrare (pf) reprezintă aceea presiune care forțează lichidele să traverseze membrana glomerulară și rezultă din interacțiunea conjugată a trei presiuni:

- presiunea capilară intraglomerulară (hidrostatică ph);
- presiunea din capsula Bowman (pc);

pf = ph - (p0 ŕ pc) = 75 - (25 + 10) = 40 mm Hg

Datorită oscilațiilor mari ale acestor parametri se apreciază că presiunea eficace de filtrare are limite cuprinse între 20-40 mm Hg.

Ca urmare a filtrării se formează circa 120-140 ml urină primară/min (aproximativ 180 l/24 ore) ceea ce face ca la un adult de 70 kg lichidul extracelular să fie filtrat de 15-16 ori în decurs de 24 ore.

Reglarea filtrării glomerulare se efectuează atât prin mecanisme extrarenale cât mai ales prin mecanisme intrarenale (autoreglare) care-i conferă acestui organ o anumită independență hemodinamică.

Tulburarea filtrării glomerulare este consecința afectării factorilor care participă la acest proces și se traduce prin modificări în cantitatea și/sau calitatea urinii primare.

Membrana filtrantă glomerulară își modifică proprietățile morfologice în cursul diverselor stări patologice: nefrite, nefroze, boli alergice, toxice etc., astfel că membrana semipermeabilă selectivă devine permeabilă, fapt ce permite trecerea proteinelor serice (proteinurie) sau chiar a sângelui (hematurie).

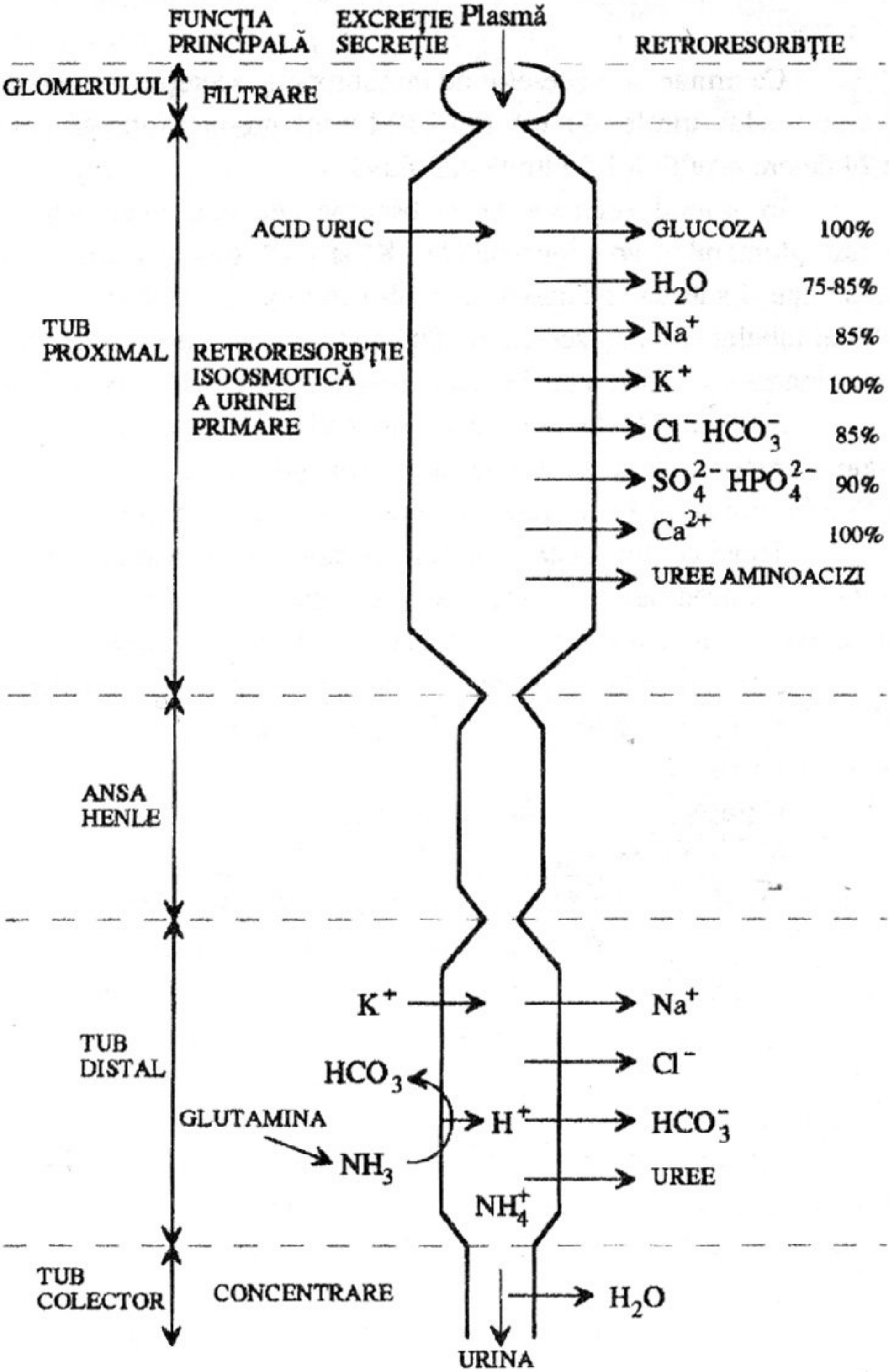



**Fig.VII.8. Schema sintetică a funcțiilor renale**

### *VII.3.3. REABSORBȚIA ȘI SECREȚIA TUBULARĂ*

Ca urmare a proceselor de reabsorbție și secreție care au loc la nivelul tubului urinifer din cei 180-200 l urină primară formată în timp de 24 de ore rezultă 1-1,5 l urină definitivă.

În primul segment se reabsoarbe cea mai mare parte din filtratul glomerular: apa, ionii de $Na^+$, $K^+$ și $Ca^{2+}$, glucoza, aminoacizii, ureea. Apa și substanțele solvite se reabsorb în proporții echivalente iar lichidul tubular rămâne izoosmotic față de plasmă. La acest nivel are lor și eliminarea unor substanțe de natură exogenă introduse în organism.

Segmentele descendent și ascendent ale ansei lui Henle asigură procesul de concentrare al urinei prin procese osmotice și electrochimice ce au loc în cele mai multe cazuri cu consum de energie.

Tubul contort distal și tubul colector definitivează procesul de diluție și concentrare al urinei; aici ea reabsoarbe (facultativ) apa, sodiul, bicarbonații și are loc secreția $H^+$, $K^+$ și a amoniacului.

Activitatea tubulară are la bază două tipuri de mecanisme:

- **activ** - efectuat prin intervenția unor complexe procese metabolice celulare;
- **pasiv** - cu eficiență mai redusă.

În funcție de comportarea față de aceste procese componenții urinari se clasifică în două grupe: **cu prag** sau **fără prag** de eliminare.

**Substanțele fără prag** sunt reabsorbite la nivelul tubular numai într-o anumită proporție indiferent de concentrația lor plasmatică dar cantitatea reabsorbită crește odată cu ridicarea nivelului lor plasmatic deși crearance-ul lor nu se modifică: ureea, sodiul, potasiul, clorul, bicarbonații etc.

**Substanțele cu prag renal** sunt **absorbite în totalitate** dar la un nivel plasmatic foarte ridicat peste pragul renal, surplusul este îndepărtat pe cale urinară: glucoza, fosfații, calciul, acidul ascorbic, aminoacizii etc.

**Tulburările** funcției tubului urinifer se referă atât la procesele de reabsorbție cât și la cele de **excreție - secreție**, deși în cele mai frecvente cazuri procesele sunt asociate.

Procesele de reabsorbție pot fi afectate în diverse stări patologice și sunt diferite de la un component la altul.

Tulburările secreției tubulare interesează în special ionii de potasiu și hidrogen. Potasiul poate fi secretat în cantități reduse datorită perturbării proceselor de schimb dintre $H^+$ și $Na^+$ dar mai ales leziunilor tubulare acute sau cronice.

Prin secreția tubulară a ionilor de $H^+$ organismul îndepărtează produșii acizi rezultați din metabolisme asigurând astfel un pH sanguin în cadrul valorilor homeostatice; lipsa secreției tubulare a $H^+$ este urmată de acumularea acestora în organism, perturbări ale metabolismului $Na^+$ și $K^+$, fosforului și mai ales a ionului amoniu, cu instalarea unei acidoze renale.

### *VII.3.4. ANALIZA URINEI. DETERMINĂRI UMORALE*

Examenul biochimic al urinei face parte din analizele indispensabile de laborator ce pot furniza date nu numai asupra stării funcționale a rinichilor dar și asupra homeostazei generale a organismului.

Activitatea funcțională a rinichiului se poate explora indirect prin determinarea unora din parametrii umorali în menținerea cărora participarea rinichiului este obligatorie. Abaterile de la valorile medii ale acestor constante reprezintă creșteri utile în evaluarea gradului de insuficiență renală, a diagnosticului și prognosticului diverselor nefropatii.

- **azotul total neproteic** al plasmei, azotul care se poate determina după precipitarea proteinelor, este format din uree, creatinină, acid uric, aminoacizi etc.
- **echilibrul hidroelectrolitic** este de un interes major pentru evaluarea eficienței rinichilor și menținerea izotoniei, izohidriei și izoosmiei organismului.

Explorarea acestora se efectuează prin determinarea electroliților sanguini și urinari.

▪ **echilibrul acido-bazic** constituie un indicator prețios în evaluarea insuficienței renale, care se însoțește aproape constant de un anumit grad de acidoză realizată prin participarea mai multor factori. Acidoza renală modifică în ionogramă coloana anionilor, traducându-se prin **diminuarea** bicarbonaților, **creșterea** sulfaților, fosfaților și clorului.

▪ **proteinele plasmatice** pot oferi date utile în cazul unei nefropatii. În acest scop se determină proteinele totale, albuminele, globulinele, fracțiunile separate electroforetic și eventual imunoelectroforetic.

## *VII.3.5. MECANISMELE FUNCȚIONALE RENALE*

### *VII.3.5.1. CLEARANCE-urile RENALE*

Majoritatea probelor funcționale renale se bazează pe principiul crearance-ului.

**Clearance-ul reprezintă volumul de plasmă** (exprimat în mililitri) **epurat de o anumită substanță în unitatea de timp** și se calculează după formula:

$$Cx = \frac{Ux \cdot V}{Px}$$, în care:

Cx = clearance-ul substanței (x) ml/min;

V = volumul urinar ml/min;

Ux = concentrația urinară a substanței (x) în mg/ml;

Px = concentrația plasmatică a substanței (x) în mg/ml.

Comportarea diferită a rinichiului față de diferitele substanțe creează clearance-uri deosebite și permite aprecierea diferitelor mecanisme funcționale ale rinichiului - irigația renală, filtrarea glomerulară, reabsorbția tubulară și secreția activă.

### *VII.3.5.2. EXPLORAREA FILTRATULUI GLOMERULAR*

Explorarea clinică a filtratului glomerular constă din următoarele probe:

- **măsurarea directă a clearance-ului** substanțelor care se elimină exclusiv prin procese de filtrare;
- **aprecierea indirectă** prin determinarea nivelului sanguin al produșilor de catabolism proteic (acid uric, uree, creatinină);
- **explorarea diferiților factori** de care depinde filtrarea glomerulară (măsurarea presiunii hidrostatice, a presiunii coloidosmotice și a presiunii intrarenale).

Explorarea filtrării glomerulare se efectuează cu o serie de substanțe care trebuie să îndeplinească mai multe condiții:

- să fie filtrate prin glomerul;
- să nu fie reabsorbite sau secretate la nivelul tubilor;
- să nu fie metabolizate în organism sau să fie toxice pentru acesta;
- să poată fi dozate în sânge și urină;
- să nu pătrundă în hematii;
- să nu se fixeze pe proteinele plasmatice;
- să fie ultrafiltrate în aceeași concentrație ca în plasmă.

Substanțele cele mai utilizate pentru aprecierea capacității de filtrare a rinichilor sunt **creatinina, ureea, inulina, manitolul.**

**Creatinina endogenă** prezintă un avantaj față de celelalte substanțe, deoarece, nesolicitând perfuzii, clearance-ul creatininei nu produce modificări circulatorii, ceea ce îi sporește exactitatea și permite cercetarea lui la orice bolnav, indiferent de starea lui clinică, fiind acceptat ca o bună măsură a filtratului glomerular pentru nevoile clinice.

Din punct de vedere clinic valoarea de diagnostic a tuturor acestor probe crește prin urmărirea lor dinamică în cursul procesului patologic.

Indiferent de substanța utilizată, tehnica este aceeași:

- bolnavul, dimineața pe nemâncate, își evacuează vezica (de preferință prin sondaj) și urina obținută se aruncă;

- se administrează bolnavului 500 ml lichid (ceai neîndulcit, la temperatura camerei) pentru asigurarea unui flux urinar de 2 ml/min;
- se injectează substanța de testat (cu excepția creatininei care se găsește în sânge);
- se recoltează urina prin sondă în două perioade de câte 40-60 minute și se fac recoltări de sânge la jumătatea perioadei;
- se dozează substanța în sânge și urină și se calculează clearance-ul pentru fiecare perioadă în parte;
- se face apoi media celor două valori obținute.

Clearance-ul substanței se consideră egal cu filtratul glomerular.

### *VII.3.5.3. FLUXUL PLASMATIC RENAL*

Există o categorie de substanțe care sunt complet eliminate într-o tură circulatoare la nivelul rinichiului, o parte filtrând prin glomerul, iar altă parte prin procesul de secreție. Clearance-ul acestor substanțe printre care se numără acidul paraaminohipuric (PAH), diodrastul ($I^{131}$), hipuran ($I^{131}$).

Fluxul plasmatic renal (FPR) reprezintă volumul de plasmă care perfuzează cei doi rinichi în decurs de 1 minut și se determină cu ajutorul clearance-ului acidului paraaminohipuric (PAH):

$$FPR = \frac{C}{E}, \text{ unde:}$$

C = clearance-ul renal al unei substanțe;

E = extracția renală a substanței.

PAH-ul rămâne dizolvat în plasmă, nu pătrunde în globulele roșii, este neutru pentru organism, nu participă la procesele metabolice și este complet eliminat din rinichi, atât prin filtrarea glomerulară cât și prin secreția tubulară.

Estimarea fluxului plasmatic renal se calculează după următoarea formulă:

$$FP = \frac{U_{PAH} \cdot V}{U_{PAH}}$$

care ne dă clearance-ul denumit **"fluxul plasmatic efectiv"** adică cel care perfuzează unitățile funcționale.

**Fluxul sanguin renal (FSR).** Cunoscând fluxul plasmatic renal, se poate calcula cu ușurință fluxul sanguin renal, cantitatea globală de sânge ce perfuzează cei doi rinichi în decurs de 1 minut, după formula:

$$FPR = \frac{C_{PAH}}{E_{PAH}} \text{ (1-hematocrit)}$$

**Fracția de filtrare.** Cunoscând filtratul glomerular și fluxul plasmatic renal, se poate calcula fracția de filtrare (FF) care exprimă proporția de plasmă filtrată la nivelul glomerular în decurs de 1 minut.

$$FF = \frac{\text{Filtrat glomerular}}{\text{Fluxul plasmatic renal}}$$

aproximativ 0,18-0,20 ceea ce însemnează că 18-20% din plasmă este filtrată ca urină primară la nivelul glomerulilor.

Tehnica probelor prezentate mai sus este aceeași ca la determinarea oricărui clearance.

# BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ


1 Borel J., Caron J., Chanard J., Gougeon M., Leuteneger F., Maquart F., Potron G., Randoux A., Zeitoun P. — Comment prescriere et interpreter un examen de biochimie. Maloine S.A. Editeur Paris, 1984

2 C. Borundel, A. Condacse, I. Rădulescu — Hiperuricemiile. Editura Medicală București, 1976

3 L. Buligescu — Bolile ficatului, căilor biliare și pancreasului. Editura Medicală București, 1985

4 M. Cucuianu, H.G. Rus, D. Niculescu, A. Voinea — Biochimie. Aplicații clinice. Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1991

5 V. Darie, Cătălina Pisoschi — Laborator clinic vol.I, Editura Lotus Craiova, 1997

6 V. Darie — Biochimie medicală vol.I. Organizarea moleculară și macromoleculară a organismului uman. Editura Amon Craiova, 1994

7 V. Darie — Biochimie medicală vol.II. Hormoni. Metabolismul intermediar. Editura Universitaria Craiova, 1998

8 C. Ionescu Târgoviște — Diabetologie modernă. Editura Tehnică, București, 1997

9 Kaplan A.L., Pesce J.A. — Clinical chemistry. C.V. Mosby Company, St Louis Baltimore Philadelphia Toronto, 1989

10 Mc Chatchey D.K. — Clinical Laboratory Medicine. Williams and Wilkins Baltimore Maryland, 1994

11 Denisa Mihele, Maria Pavlovici — Biochimie clinică - Metode de laborator. Editura Medicală București, 1996

12 Denisa Mihele — Biochimie clinică - Compendiu. Editura Medicală București, 1997

13 Moss D., Rosalki S. — Enzyme Tests in Diagnosis, Arnold London, 1996

14 Robbins L.S., Kumar V. — Pathologic Basis of Disease. W.B. Sannders Company

15 M. Șerban, G. Câmpeanu, Emanuela Ionescu — Metode de laborator în biochimia animală. Editura Didactică și Pedagogică București, 1993

16 D. Tănăsescu, V. Darie, Margareta Grigorescu, Ileana Radulian — Lucrări practice de biochimie medicală vol.I. Reprografia Universității din Craiova, 1983

17 D. Tănăsescu, V. Darie, Margareta Grigorescu, Ileana Radulian — Lucrări practice de biochimie medicală vol.II. Reprografia Universității din Craiova, 1991

18 Vevera I. Valeriu — Fiziopatologia și clinica fierului. Editura Medicală București, 1978

19 Radu Mihai Vasile — Sisternul internațional de unități în medicină. Editura Medicală București, 1985

UNIVERSITATEA DE MEDICINA ȘI FARMACIE
BIBLIOTECA nr. 1 PRECLINIC
Nr. de inventar: 1652
Cotă: II 76.469
CRAIOVA

RMF 4/2000

Tehnoredactarea computerizată
Sorin Stroe